

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NEUROQUÍMICAS EM RATOS
COM DIETA HIPERPALATÁVEL: UM MODELO PARA DIABETES
MELLITUS TIPO II**

Cíntia Eickhoff Battú

Porto Alegre, Novembro/2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Cíntia Eickhoff Battú

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NEUROQUÍMICAS EM RATOS
COM DIETA HIPERPALATÁVEL: UM MODELO PARA DIABETES
MELLITUS TIPO II**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação
em Neurociências da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como pré-requisito parcial
para obtenção do título de doutor em
Neurociências

Orientadores: Marcos Luiz Santos Perry
Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Porto Alegre, Novembro/2011.

Ao mestre Marcos Luis Santos Perry (in memorian), que me ensinou a importância do conhecimento e da pesquisa, e sobretudo, o valor da ética. Minha eterna gratidão.

O importante não é aquilo que fazem de nós, mas o que nós mesmos fazemos do
que os outros fizeram de nós.

Jean Paul Sartre

RESUMO

A obesidade é uma desordem que resulta do acúmulo excessivo de tecido adiposo e sua disfunção, e está associada ao risco de patologias como o Diabetes Mellitus. Muitas são as causas para o seu desenvolvimento, mas a mais importante, provavelmente, é o consumo aumentado de alimentos ricos em açúcar e gorduras. Diabetes é uma das mais importantes e prevalentes desordens crônicas. Afeta cerca de 250 milhões de pessoas no mundo, com 6 milhões de casos diagnosticados a cada ano. A dieta hiperpalatável tem sido bem descrita como indutora do aumento do peso corporal e massa de tecido adiposo bem como do desenvolvimento de desordens associadas. Portanto, esta dieta tem sido amplamente utilizada como modelo de obesidade e Diabetes Mellitus tipo II. O aquecimento de dietas ricas em açúcar ou gorduras leva ao aumento da produção de produtos finais avançados de glicação (AGEs), o que parece agravar os sintomas induzidos pela dieta. Em face disto, tivemos por objetivo induzir o modelo de diabetes e obesidade nos ratos através dieta hiperpalatável, aquecida ou não. Analisamos primeiramente parâmetros metabólicos periféricos (teste de tolerância a glicose, ácidos graxos livres, triacilgliceróis), que confirmaram a eficácia do modelo. Posteriormente, observamos alterações na via de sinalização da insulina induzidas pela dieta. Foram analisadas as proteínas PI3K, Akt e IRS-1 em hipocampo e hipotálamo dos ratos. Além disso, observamos alterações metabólicas, dano oxidativo, alterações no sistema glutamatérgico, na quantidade da proteína GFAP e por fim, indícios de alterações comportamentais, com sinais de aumento da ansiedade e diminuição da atividade locomotora.

ABSTRACT

Obesity is a disorder resulting from excess adipose tissue and its dysfunction and is associated with risk of diseases such as Diabetes Mellitus. There are many causes for obesity but the most important is probably the overeating and the ready availability of food rich in fat and sugar. Diabetes is one of the most important and prevalent chronic disorders. It currently affects 250 million people worldwide, with 6 million new cases reported each year. Palatable diet has been described as an inducer of increased body weight and adipose tissue mass and the development of associated disorders. So this diet has been widely used as a model of obesity and diabetes mellitus type II. The heating of diets rich in sugar or fat leads to increased production of advanced glycation end products (AGEs), which seem to aggravate the symptoms induced by diet. For that reason, the objective was to induce a model of diabetes and obesity in rats by palatable diet, heated or not. First analyzed peripheral metabolic parameters (glucose tolerance test, free fatty acids, triglycerides), which confirmed the effectiveness of the model. Subsequently, we observed changes in the insulin signaling pathway induced by diet. We analyzed the proteins PI3K, Akt and IRS-1 in hippocampus and hypothalamus of rats. Moreover, we observed metabolic changes, oxidative damage, changes in the glutamatergic system, the amount of GFAP protein and finally, signs of behavioral changes, signs of increased anxiety and decreased locomotor activity.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador, Marcos Luiz Santos Perry, pelos caminhos apontados, pelo estímulo, pela paciência e pela amizade.

Ao CA, por ter assumido minha orientação sempre com muito empenho e por sua amizade.

Aos colegas do laboratório 27, em especial a Débora.

A professora Regina Pessoa e suas orientandas Luana e Samanta.

A minha família que sempre me apoiou, em especial aos meus filhos Lucas e Gabriel que sempre entenderam minha ausência.

Ao departamento de PPG neurociências e funcionários.

Ao departamento de bioquímica.

A CAPES, pelo fornecimento de minha bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
PARTE I	
1.INTRODUÇÃO.....	12
1.1. OBESIDADE.....	14
1.2. RESISTÊNCIA À INSULINA.....	15
1.3. SÍNDROME METABÓLICA.....	16
1.4. DIABETES MELLITUS.....	16
1.5. PRODUTOS FINAIS AVANÇADOS DE GLICAÇÃO	17
1.6. ESTRESSE OXIDATIVO.....	21
1.7. DIETA HIPERPALATÁVEL.....	23
1.8. DIABETES MELLITUS, DIETA E COGNIÇÃO.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
PARTE II – ARTIGOS	
3. ARTIGO I.....	29
4. ARTIGO IICAPÍTULO II.....	49
PARTE III	
5. DISCUSSÃO.....	70
ANEXO I.....	81
ANEXO II.....	83
ANEXO III.....	86
ANEXO IV.....	87
6. REFERÊNCIAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da reação de Maillard.....	12
Figura 2. Rotas de formação dos produtos finais avançados de glicação (AGEs) com ênfase à reação de Maillard <i>in vivo</i>	17

ABREVIATURAS

AGL = Ácidos graxos livres

AGEs = Produtos finais avançados de glicação (do inglês “*Advanced Glycation End Products*”)

ALR = Aldeído redutase

CPT-1 = Sistema de transporte carnitina-palmitoil-1

DM = Diabetes Mellitus

DA = Doença de Alzheimer

ERO = Espécies reativas de oxigênio

GSH = Glutathiona

HPF = Dieta hiperpalatável

HPFh = Dieta hiperpalatável aquecida

IMC = Índice de Massa Corporal

MG = Metilglioxal

LDL = Lipoproteínas de baixa densidade

OMS = Organização Mundial de Saúde

PKC = Proteína cinase C

RI = Resistência à insulina

SM = Síndrome metabólica

SNC = Sistema nervoso central

TCA = Ciclo do ácido tricarboxílico

UCPs = Proteínas desacopladoras

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos tem havido uma mudança muito grande tanto na composição da dieta diária, quanto como nos hábitos alimentares das sociedades ocidentais, em que uma percentagem crescente da população consome principalmente dietas ricas em gordura, ou carboidratos, além de dietas com excesso de calorias. Essas dietas chamadas ocidentais promovem uma série de distúrbios metabólicos e aumento da morbidade (Weisburger 1997; Shaw, Hall et al. 2005). O efeito melhor documentado na literatura são aumento da incidência de obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipertensão e doença cardiovascular.

A obesidade é definida como um excesso de gordura associado com o aumento em número e tamanho das células adiposas. Atualmente, cerca de 1 bilhão de pessoas estão com sobrepeso ou obesas. Como consequência desta obesidade, 60% de todos os casos de diabetes mellitus tipo II podem ser atribuídos ao sobrepeso (Smyth and Heron 2006).

O acúmulo de gordura visceral e hepática estão este fortemente correlacionados ao desenvolvimento e à severidade da resistência à insulina (Seppala-Lindroos, Vehkavaara et al. 2002; Kelley, McKolanis et al. 2003). O aumento da massa do tecido adiposo, principalmente o tecido adiposo visceral, ocasiona um aumento dos ácidos graxos livres circulantes, com consequente aumento de triglicerídeos no fígado, músculo esquelético, cardíaco, e células β -das ilhotas de Langerhans (Seppala-Lindroos, Vehkavaara et al. 2002; Kelley, McKolanis et al. 2003; Orci, Cook et al. 2004). Resistência à insulina é a diminuição da habilidade da insulina em controlar a produção hepática de glicose e em aumentar sua utilização pelos tecidos (Walker, Connacher et al. 1995).

Dietas hiperpalatáveis conduzem ao aumento de adiposidade, resistência à insulina e dano ao metabolismo glicídico em ratos e em humanos (Pichon, Huneau et al. 2006; Terauchi, Takamoto et al. 2007). Estudos mostram que estas dietas levam ao aumento dos níveis de estresse oxidativo, principalmente em longo prazo (a partir de 4 meses de dieta) (Studzinski, Li et al. 2009). Espécies reativas de oxigênio (ERO) causam dano oxidativo em componentes mitocondriais sob a forma de peroxidação lipídica, modificações protéicas e mutação ao DNA (James and Murphy 2002), levando a uma disfunção mitocondrial, que irá

contribuir para uma larga escala de patologias incluindo doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, diabetes e a degeneração associada à idade (Slim, Toborek et al. 1996).

Está bem estabelecido que o preparo dos alimentos a temperaturas elevadas (acima de 120°C) produzem glicotoxinas conhecidas como produtos avançados de glicação (AGE, do inglês “*Advanced Glycation End Products*”) (Thornalley 2005; Uribarri, Cai et al. 2005). A produção destas glicotoxinas (exógenas) é dependente da temperatura, do tempo de preparo dos alimentos, do método de preparo e da composição dos alimentos (Thornalley 2005; Uribarri, Cai et al. 2005). As reações que produzem as glicotoxinas exógenas e endógenas são conhecidas como reações de Maillard (Figura 1) (Thornalley 2005; Uribarri, Cai et al. 2005).

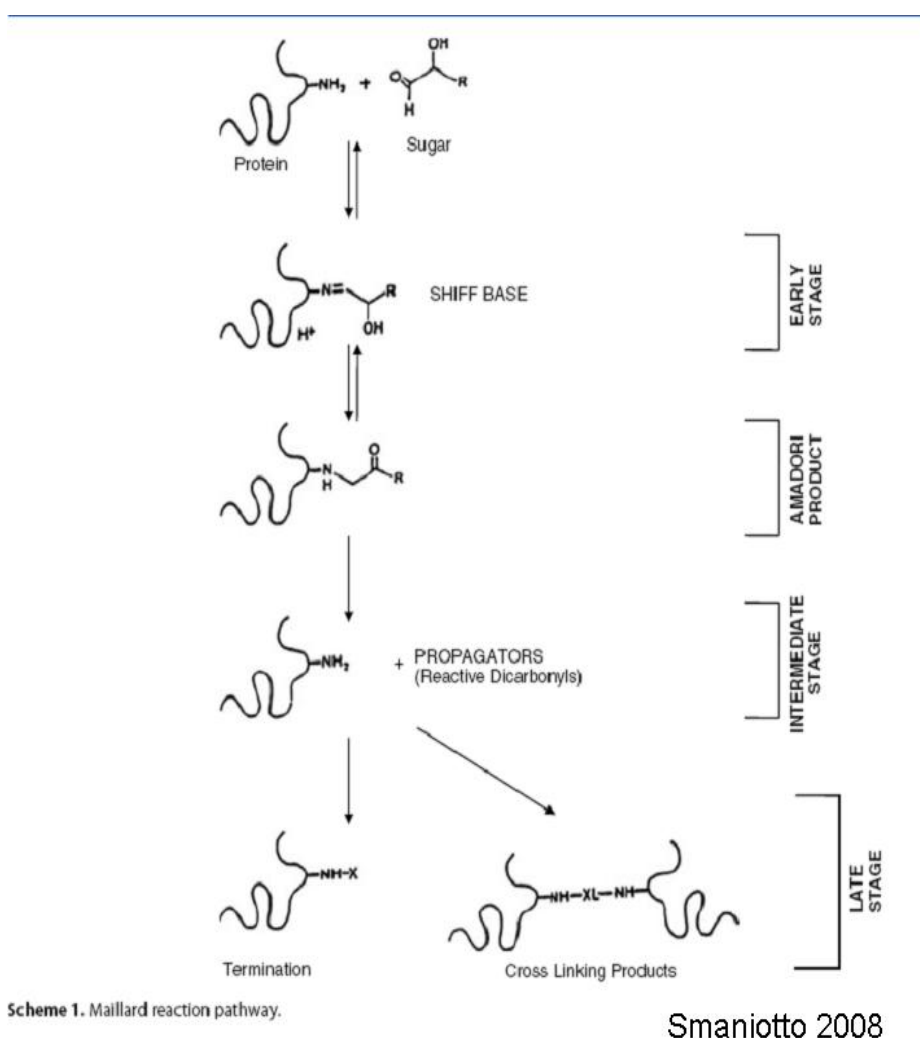


Figura 1. Etapas da reação de Maillard

O aumento dos níveis plasmáticos de AGEs, gerado pela reação não enzimática de grupos amino e açúcares reduzidos, está implicado em diversas doenças crônicas caracterizadas pelo aumento de estresse oxidativo e dano inflamatório, incluindo retinopatia, nefropatia e insuficiência cardíaca associadas ao diabetes (Finkel and Holbrook 2000; Vlassara and Palace 2002).

1.1. OBESIDADE

A obesidade é o excesso de gordura corporal de tal forma que a saúde pode ser prejudicada. A definição quantitativa da obesidade é o IMC (Índice de Massa Corporal) superior a 30kg/m². A obesidade é uma das doenças mais prevalentes nos países desenvolvidos, e sua incidência aumenta rapidamente (Walker, Strong et al. 2007). É um estado pró-inflamatório, o tecido adiposo hipertrofiado é resistente à insulina e à leptina e apresenta um acentuado aumento na liberação de ácidos graxos e citocinas pró-inflamatórias (Despres and Lemieux 2006). A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de várias doenças associadas, como diabetes, hipertensão e doenças cardíacas (Lee, Koh et al. 2005).

Alterações na massa de tecido adiposo resultam de mudanças no tamanho e/ou número dos adipócitos. O crescimento e diferenciação dos adipócitos envolvem mecanismos complexos, caracterizados por múltiplas mudanças na morfologia celular, sensibilidade hormonal, e expressão gênica (Brun, Kim et al. 1996; Klaus 1997).

Nos Estados Unidos, estima-se que 300.000 pessoas morrem a cada ano e US\$117 bilhões são gastos direta ou indiretamente, como resultado da obesidade (Stein and Colditz 2004). Na Inglaterra, o percentual de indivíduos classificados como obesos aumentou de 13,2% para 23,6% nos homens e de 16,4% para 23,8% nas mulheres entre 1993 e 2004. Crianças com idade de 2-10 anos (usando IMC adequado para sexo e idade) apresentaram aumento de obesidade de 9,9% para 13,1% entre 1995 e 2003 (Druce and Bloom 2006).

A obesidade, especialmente a obesidade visceral, contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina, a qual pode estar por traz de uma série de manifestações e complicações cardiovasculares do diabetes e da síndrome metabólica (Reaven 1988).

1.2. RESISTÊNCIA À INSULINA (RI)

A RI é definida como um decréscimo da resposta dos tecidos periféricos à ação da insulina. Indivíduos com resistência à insulina estão predispostos ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo II. RI é reconhecida como integrante das características da chamada síndrome metabólica, que compreende intolerância à glicose, resistência à insulina, obesidade, hipertrigliceridemia, baixo colesterol HDL, hipertensão e aterosclerose (Xu, Barnes et al. 2003).

RI nos adipócitos leva à acelerada lipólise com subsequente elevação dos ácidos graxos livres (AGL) circulantes. Transporte aumentado de AGL do sangue para o músculo, fígado e células beta-pancreáticas podem prejudicar a ação da insulina e sua secreção, duas características dos distúrbios metabólicos no Diabetes Mellitus tipo II (DMII) (Reaven 1988). Além disso, a resistência à insulina está associada a defeitos mitocondriais (Richardson, Kashyap et al. 2005), que podem limitar a oxidação dos ácidos graxos e favorecer o acúmulo de acil-CoA graxo intracelular e outros produtos tóxicos do metabolismo lipídico (ceramidas, diacilglicerol, entre outros). Na presença de hiperglicemia, ocorre o acúmulo de malonil-CoA intracelular, o que leva à redução da oxidação de ácidos graxos por inibição do sistema de transporte carnitina-palmitoil-1 (CPT-1). Este é requerido para transportar ácidos graxos de cadeia longa do citosol para a mitocôndria, onde a beta-oxidação destes ácidos graxos acontece. O acúmulo de acil-CoA graxo intracelular prejudica a ação da insulina no músculo esquelético e leva à RI.

A RI aumenta a produção de glicose que determina uma maior produção de insulina pelas células β -das ilhotas de Langerhans. Num primeiro momento há hipertrofia e hiperplasia das células β com o aumento da lipotoxicidade, glicotoxicidade e do estresse oxidativo destas células, ocorrendo, portanto, uma morte acentuada das células β (Orci, Ravazzola et al. 1990; Orci, Unger et al. 1990). A RI está associada ao aumento do risco cardiovascular bem como ao risco de desenvolvimento de diabetes. Portanto, a intervenção precoce para o tratamento da RI é uma estratégia importante de saúde preventiva.

1.3. SÍNDROME METABÓLICA (SM)

O agrupamento de fatores de risco cardiovascular em associação com distúrbios do metabolismo da glicose e dos lipídios tem sido referido muitas vezes como síndrome metabólica (SM) (Reaven 2004; Reaven 2005). A SM é um transtorno complexo, representado por um conjunto de fatores de riscos cardiovasculares relacionados com a distribuição central de lipídios e RI (Kahn, Buse et al. 2005). Esses fatores de risco incluem dislipidemia, obesidade central, alterações na homeostase da glicemia e hipertensão. A prevalência da SM na população geral é de cerca de 24%, atingindo mais de 80% entre pacientes com Diabetes tipo II (DMII) (Costa, Canani et al. 2004). SM é um importante fator de risco para a mortalidade precoce em indivíduos não diabéticos (Isomaa, Almgren et al. 2001; Lakka, Laaksonen et al. 2002) e nos pacientes com DMII (Isomaa, Almgren et al. 2001).

A SM tem sido utilizada como uma ferramenta clínica para a detecção precoce do DMII e doença cardiovascular (Alberti and Zimmet 2008). Estima-se que pessoas com SM apresentam duas vezes mais risco de desenvolver doença cardiovascular em comparação com aqueles sem a síndrome, e cinco vezes mais chance de desenvolver DMII (Grundy 2008).

1.4. DIABETES MELLITUS (DM)

O Diabetes Mellitus (DM) é umas das mais importantes doenças crônicas. Ela afeta atualmente cerca de 250 milhões de pessoas no mundo todo, com 6 milhões de novos casos a cada ano (Cole, Astell et al. 2007). Essa prevalência aumenta com a idade, de 12% em pessoas entre 65-70 anos de idade para 15% em pessoas com cerca de 80 anos de idade (Wild, Roglic et al. 2004). DM é um grupo de alterações metabólicas caracterizadas principalmente pela hiperglicemia (aumento dos níveis de glicose plasmáticos), resultado de defeitos na sua ação ou secreção de insulina, ou em ambos.

As complicações incluem alterações patológicas de pequenos e grandes vasos,

nervos cranianos e periféricos, pele e olhos. Estas lesões orgânicas podem levar à hipertensão, falência renal, perda da visão, neuropatia autonômica e periférica, desordens vasculares periféricas, infarto do miocárdio e desordens cerebrovasculares, incluindo isquemia (Zhao, Zhang et al. 2008). O DM também tem sido implicado como fator de risco para demência não somente do tipo vascular, mas também Doença de Alzheimer (DA) (Ott, Sanders et al. 2007). Pacientes com DMI e DMII tem apresentado déficits cognitivos, associados com desempenho reduzido em múltiplas funções cognitivas (Biessels, Deary et al. 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (Alberti and Zimmet 1998) em conjunto com outras organizações, propôs uma nova classificação para as principais formas de diabetes:

- A categoria designada tipo I inclui todas as formas que são causadas por destruição primária auto-imune das células β do pâncreas ou algum outro tipo de defeito primário da função deste tipo celular, que leve a uma secreção de insulina insuficiente para os tecidos periféricos alvo.
- A categoria designada tipo II inclui a forma mais comum de diabetes, resultante da resistência dos tecidos periféricos alvo à ação da insulina, combinada a uma secreção inadequada de tal hormônio.

1.5 PRODUTOS FINAIS AVANÇADOS DE GLICAÇÃO

Os Produtos Finais Avançados de Glicação (AGEs) são um grupo heterogêneo de moléculas, produzidas por glicação e oxidação *in vivo*. A glicação é a principal causa espontânea de dano a proteínas celulares e extracelulares em sistemas fisiológicos, acometendo cerca de 0,1 a 0,2 % de resíduos de arginina e de lisina (Thornalley, Langborg et al. 1999; Thornalley, Battah et al. 2003).

A glicação não-enzimática de proteínas, ou reação de Maillard (figura 2), está relacionada à hiperglicemia crônica e, conseqüentemente, a uma série de alterações fisiopatológicas importantes no desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes e de doenças neurodegenerativas, e ocorre entre açúcares redutores e grupos amino livres das

proteínas, via adição nucleofílica, formando bases de Schiff. Essas bases são rearranjadas para uma forma mais estável e essencialmente irreversível, chamada de produtos de Amadori. Durante esta reorganização, grupos intermediários carbonila são acumulados. Estes compostos são conhecidos como α -dicarbonilas ou oxoaldeídos, incluindo a 3-deoxiglicose e o metilglicoxal (Baynes and Thorpe 1999). As α -dicarbonilas têm a habilidade de reagir com grupos amino, sulfidrila e guanidina em proteínas. As α -dicarbonilas podem também reagir com grupos lisina e arginina de proteínas, formando compostos estáveis como os aductos (Basta, Berti et al. 2008).

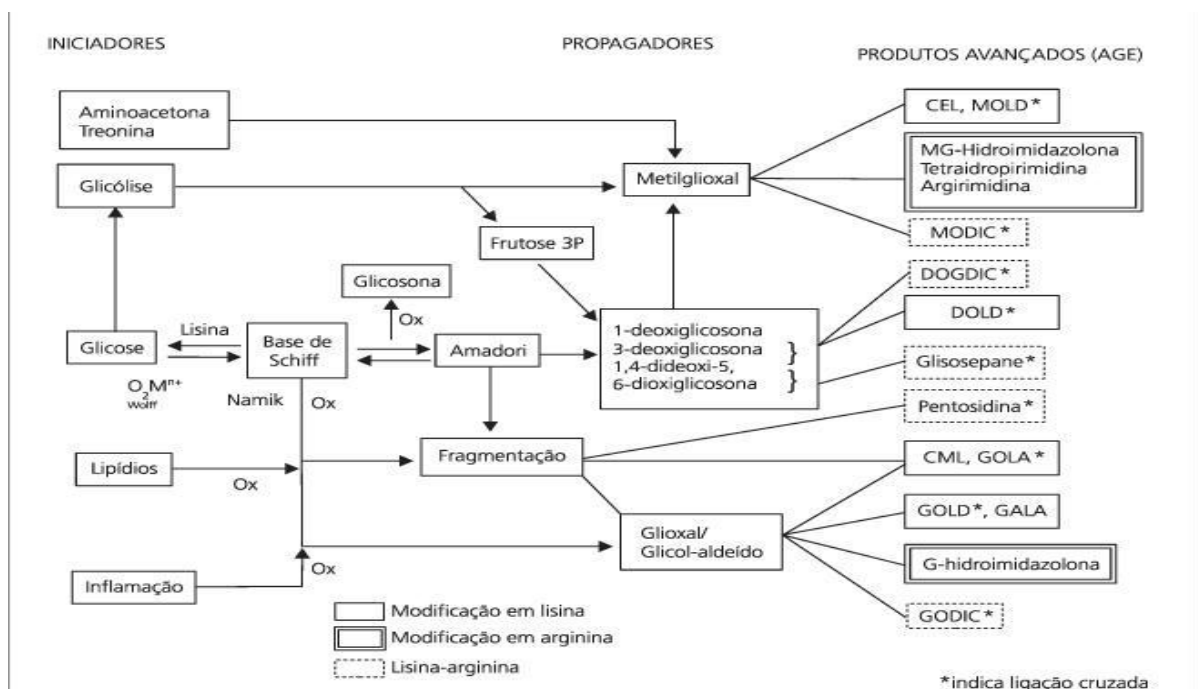


Figura 2. Rotas de formação dos produtos finais avançados de glicação (AGEs) com ênfase à reação de Maillard *in vivo* (Monnier and Wu 2003). CML: carboximetil lisina; carboxietil lisina (CEL); DOGDIC: ligação cruzada imidazolina derivada de 3-deoxiglicose; DOLD: dímero de lisina e 3-deoxiglicose; GOLA: glioxal lisina amida; GOLD: dímero de glioxal-lisina, GALA: ácido glioxílico lisina amida; GODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de glioxal; MODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de metil glioxal; MOLD: dímero de metilglioxal-lisina.

Atualmente, são conhecidos diferentes tipos de AGEs, sendo classificados de acordo com a sua origem. Takeuchi e colaboradores (Takeuchi and Yamagishi 2004), reconheceram seis classes distintas de AGEs: os derivados de glicose (AGE-1), os derivados de outros carboidratos, como os de gliceraldeído (AGE-2), os de alfa-dicarbonila, como os glicoxal (AGE-3), metilglioxal (AGE-4), glioxal (AGE-5), 3-deoxiglicose (AGE-6).

Glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicossone são formados na glicação de proteínas por glicose, entretanto, glioxal é também formado na peroxidação de lipídios, metilglioxal pela fragmentação de trioses fosfato e pelo catabolismo da acetona e de treonina, e a 3-deoxiglicossone a partir de glicose-3-fosfato. Em alguns casos, a glicação está envolvida não somente com a glicose, mas também com compostos formados pela glicação por outros compostos já formados por glicoxidação. A partir da glicose, a via não oxidativa pode gerar pirralina; na via oxidativa pode gerar pentosidina e N-6-carboximetilisina.

Os AGEs provêm de fontes exógenas e endógenas:

1) Endógenas: Pessoas diabéticas têm níveis mais elevados de AGEs do que as não diabéticas porque tanto a hiperglicemia como o estresse oxidativo contribuem para esse acúmulo. Estudos mostram que pessoas com diabetes sem complicações apresentam cerca de 20 a 30% mais AGEs que pessoas saudáveis, e pessoas com diabetes tipo II com complicações por doença arterial coronariana ou microalbuminúria apresentam de 40 a 100% mais AGEs que pessoas saudáveis (Sharp, Rainbow et al. 2003).

2) Exógenas: Os AGEs derivados da dieta são similares aos AGEs endógenos no que diz respeito a suas propriedades pró-oxidantes e inflamatórias (Cai, Gao et al. 2002; Uribarri, Cai et al. 2007) A ingestão de produtos de glicação e lipoxidação pode acelerar a geração de radicais livres induzindo ao estresse oxidativo via carbonilação (Miyata, Ishikawa et al. 2003).

Os principais danos gerados pelo glioxal e MG no organismo são devidos a reações reversíveis e irreversíveis com lisina, arginina e resíduos de cisteína de proteínas, além de grupos amino de DNA/RNA e lipídios, o que resulta na formação de proteínas com ligações cruzadas (gliosilamina, derivados imidazol, N^ε-carboximetilisina, entre outros). A formação destes adutos com proteínas pode provocar a inativação de proteínas celulares críticas, o que pode levar a apoptose, necrose ou retardo no crescimento celular. Além disso, o acúmulo de glioxais e AGEs tem sido relacionado a doenças cardiovasculares, cataratogênese, doenças musculares, complicações associadas ao DM, doenças de Alzheimer e Parkinson entre outras. Porém, a extensão da glicação de proteínas sob condições fisiológicas é tipicamente de 0,01-0,1% de resíduos de lisina e arginina e 0,1-16% de fosfolipídios básicos, sendo suprimida pela detoxificação enzimática destes -oxoaldeídos reativos (Shangari,

Depeint et al. 2005; Shangari, Chan et al. 2006; Shangari, Depeint et al. 2007).

Em condições fisiológicas normais, o glioxal e MG são detoxificados endogenamente por duas vias enzimáticas diferentes. A principal delas é o sistema glioxalase citosólico, o qual é composto pelas enzimas glioxalase I e II que convertem o glioxal em glicolato e o MG em D-lactato, na presença de glutathiona (GSH). Outra via de detoxificação secundária é catalisada pela família das oxido-redutases: aldeído redutase (ALR1), aldose redutase (ALR2) e carbonil redutase (ALR3); enzimas localizadas no citosol que possuem uma ampla especificidade pelo substrato e necessitam de NADPH ou NADH como cofatores (Shangari, Chan et al. 2006; Shangari, Depeint et al. 2007). Sob condições de estresse oxidativo, os níveis de GSH são reduzidos, o que prejudica a detoxificação destes α -oxoaldeídos, aumentando os níveis intracelulares de glioxal e MG e, conseqüentemente, a formação de AGES (Shangari and O'Brien 2004). Além disso, acredita-se que diversas enzimas celulares vitais, como α -cetoglutarato desidrogenase, tioredoxina redutase, GSH redutase, GSH peroxidase, superóxido dismutase e desidrogenases envolvidas na síntese de NADPH, sejam inativadas no processo de glicação promovido por estes compostos (Shangari, Chan et al. 2006), o que poderia contribuir para o surgimento das diversas patologias associadas a estes, provavelmente devido ao estresse oxidativo desencadeado ou a deficiências nas defesas antioxidantes do organismo (Abordo, Minhas et al. 1999).

Os AGE podem danificar as células por meio de três mecanismos básicos. O primeiro consiste na modificação de estruturas intracelulares, incluindo aquelas envolvidas com a transcrição gênica. O segundo mecanismo envolve a interação de AGEs com proteínas da matriz extracelular, modificando a sinalização entre as moléculas da matriz e a célula, gerando uma disfunção. O terceiro mecanismo, por fim, refere-se à modificação de proteínas ou lipídeos sanguíneos. As proteínas e os lipídios circulantes modificados podem, então, se ligar a receptores específicos, promovendo a produção de citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento, os quais, por sua vez, contribuem para a doença vascular (Monnier and Wu 2003; Brownlee 2005).

1.6. ESTRESSE OXIDATIVO

A formação de espécies ativas de oxigênio pode alterar a integridade genômica celular. Espécies ativas de oxigênio e espécies ativas de carbonil causam dano celular e reagem diretamente com DNA, proteínas e lipídios (Berlett and Stadtman 1997). Espécies reativas de oxigênio são também geradas durante a formação de AGEs, causando uma autopropagação do ciclo de formação AGEs/espécies reativas de oxigênio, que ocorre em doenças como o diabetes (Forbes, Soldatos et al. 2005).

DM é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia e insuficiência na ação ou secreção da insulina. O aumento do estresse oxidativo está presente no desenvolvimento e na progressão do diabetes e suas complicações (Baynes and Thorpe 1999; Ceriello, Morocutti et al. 2000). Diabetes é geralmente acompanhada pelo aumento na produção de radicais livres (Baynes and Thorpe 1999); e/ou prejuízo nas defesas antioxidantes (Saxena, Srivastava et al. 1993). Os mecanismos que levam ao aumento do estresse oxidativo no diabetes são parcialmente esclarecidos, e envolvem a ativação de fatores de transcrição, AGEs e proteína cinase C (Maritim, Sanders et al. 2003).

Níveis altos de radicais livres causam danos a proteínas celulares, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos, e eventualmente morte celular. Vários mecanismos têm sido sugeridos na formação de espécies reativas de oxigênio. Acredita-se que a oxidação da glicose é a principal fonte de radicais livres. Na sua forma enediol, a glicose é oxidada numa reação metal-dependente, a um radical enediol que é convertido em cetoaldeídos reativos e radicais superóxido. O radical superóxido sofre dismutação a peróxido de hidrogênio, que, se não for degradado pela catalase ou superóxido dismutase, e na presença de metais de transição, pode levar a produção de radicais hidroxila, extremamente reativos (Jiang, Woollard et al. 1990). Os radicais superóxido podem também reagir com radicais peroxinitrito (Hogg, Darley-USmar et al. 1993). A hiperglicemia promove peroxidação lipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) de maneira superóxido dependente, resultando na formação de radicais livres (Kawamura, Heinecke et al. 1994). Outra importante fonte de radicais livres no diabetes é a interação da glicose com proteínas levando a formação de produtos de Amadori e então os AGEs (Hori, Yan et al. 1996). Estes AGEs via receptores específicos, os RAGEs, inativam

enzimas e alteram suas estruturas e funções (McCarthy, Etcheverry et al. 2001), promovem a formação de radicais livres (Baynes and Thorpe 1999). Ao aumentar o estresse oxidativo intracelular, os AGEs ativam o fator de transcrição NF- κ B, promovendo assim a regulação de vários genes. NF- κ B aumenta a produção de óxido nítrico, que, acredita-se ser um mediador no dano causado às células beta (Mohamed, Bierhaus et al. 1999).

Uma teoria muito aceita hoje em dia é a Teoria Unificadora, descrita por Brownlee (Brownlee 2005). Existem quatro complexos protéicos da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, chamados complexo I, II, III e IV. Quando a glicose é metabolizada através do Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), gera doadores de elétrons. O principal doador de elétrons é o NADH, que doa elétrons ao complexo I. Os outros doadores de elétrons gerados pelo TCA são FADH₂, formado pela succinato desidrogenase, que doa elétrons ao complexo II. Elétrons de ambos complexos são passados para a coenzima Q e desta para o complexo III, o citocromo-C e o complexo IV e, finalmente, ao oxigênio molecular, que os reduz a água. O sistema de transporte de elétrons está organizado desta forma para que o nível de ATP seja precisamente regulado. Como os elétrons são transportados da esquerda para a direita, alguma energia dos elétrons é utilizada para bombear prótons através da membrana nos complexos I, III e IV, o que acaba gerando tensão em toda membrana mitocondrial. A energia deste gradiente de tensão impulsiona a síntese de ATP, pela ATP sintetase (Trumpower 1990; Wallace, Shoffner et al. 1992). Alternativamente, as proteínas desacopladoras (UCPs), desviam o gradiente para formação de calor, como uma forma de manter a taxa de formação de ATP constante. Isto é o que acontece nas células normais.

Ao contrário, em pacientes diabéticos, há mais glicose a ser oxidada no TCA, o que acaba gerando mais doadores de elétrons (NADH, FADH₂) na cadeia de transporte de elétrons. Como resultado, o gradiente de tensão através da membrana mitocondrial aumenta, até o limiar crítico ser atingido. Neste ponto, a transferência de elétrons pelo complexo III é bloqueada, causando a volta dos elétrons para a coenzima Q, que doa elétrons ao oxigênio molecular, formando superóxido. A isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase degrada esse oxigênio em peróxido de hidrogênio, que é então convertido em H₂O e O₂ por outras enzimas (Brownlee 2005). Assim, segundo Brownlee, o estresse oxidativo altera a atividade de enzimas importantes da via do poliol, das hexosaminas, formação de AGEs e proteína cinase C (PKC).

1.7. DIETA HIPERPALATÁVEL

O peso corporal depende de um equilíbrio entre o consumo e o gasto de energia. Vários mecanismos moleculares estão envolvidos na regulação destes processos, e o tecido adiposo tem importante e ativo papel nesta regulação. O tecido adiposo branco armazena triacilgliceróis e libera ácidos graxos conforme a necessidade do organismo, bem como secreta várias adipocitocinas importantes na regulação da ingesta energética, metabolismo lipídico e homeostase da glicose (Pond and Mattacks 1991). Por outro lado, o tecido adiposo marrom dissipa seus depósitos de gordura, produzindo calor (termogênese adaptativa) como consequência do desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial (Lowell and Spiegelman 2000).

A obesidade é uma desordem que resulta do excesso de tecido adiposo e também de sua disfunção, e está associada ao risco de patologias como doenças cardiovasculares e diabetes (Must and Strauss 1999). Alterações na massa de tecido adiposo resultam de mudanças no tamanho e/ou número dos adipócitos. O crescimento e diferenciação dos adipócitos envolvem mecanismos complexos, caracterizados por múltiplas mudanças na morfologia celular, sensibilidade hormonal, e expressão gênica, que, eventualmente, levam ao fenótipo dos adipócitos maduros expressar genes que controlam o metabolismo lipídico e a termogênese (Brun, Kim et al. 1996; Klaus 1997).

A dieta hiperpalatável ou dieta de cafeteria tem sido bem descrita como indutora do aumento do peso corporal e massa de tecido adiposo em ratos após curto período de tempo (Roca, Rodriguez et al. 1999; Rodriguez, Quevedo-Coli et al. 2001). Vários tipos de dietas ricas em lipídios e/ou carboidratos têm sido utilizados para estudar os efeitos destas dietas sobre o metabolismo e ganho de peso corporal.

A dieta hiperpalatável promove um número de distúrbios metabólicos bem estabelecidos e aumento da morbidade (Lichtenstein, Kennedy et al. 1998; Shaw, Hall et al. 2005). Os efeitos melhores documentados relativos ao consumo desta dieta incluem aumento na incidência de obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipertensão e desordens cardiovasculares.

O consumo desta dieta altera os níveis de adiponectina (Ronti, Lupattelli et al. 2006), os quais podem promover um número de efeitos deletérios em diferentes órgãos. Além disso, o consumo da dieta hiperpalatável promove alterações bioquímicas em vários tecidos. Estudos têm mostrado que o consumo desta dieta aumenta os níveis de estresse oxidativo (Milagro, Campion et al. 2006; Roberts, Barnard et al. 2006; Bullo, Casas-Agustench et al. 2007), incluindo o aumento dos níveis de oxidação protéica e peroxidação lipídica.

Nas sociedades modernas, o consumo de grandes quantidades de açúcares e lipídios, bem como um estilo de vida sedentário, tem sido associado a distúrbios metabólicos e comprometimento da função cerebral (Schrauwen, Wagenmakers et al. 2000; Unger and Orci 2001; Molteni, Barnard et al. 2002). Estudos em humanos com sobrepeso ou obesos mostram aumento na taxa de transtornos psiquiátricos, em especial transtornos de humor e ansiedade (Becker, Margraf et al. 2001; Chakravarthy and Booth 2004; Simon, Von Korff et al. 2006; Teegarden and Bale 2007).

Colantuoni e colaboradores (Colantuoni, Rada et al. 2002) demonstraram que o consumo contínuo e excessivo de açúcar leva a um perfil de dependência e aumenta o comportamento de ansiedade quando os animais são privados de açúcar.

1.8. DIABETES MELLITUS, DIETA E COGNIÇÃO

A manutenção das funções cognitivas com o envelhecimento e uma preocupação crescente. O estilo de vida tem um papel muito importante para um envelhecimento saudável do SNC. Um fator importante é a dieta, ou o padrão de alimentação e bebidas de um indivíduo, que pode tanto exercer benefícios quanto prejuízos. Estudos mostram que ratos submetidos a uma dieta rica em lipídios, principalmente lipídios saturados, apresentam perda cognitiva (Parrott and Greenwood 2007).

As complicações em longo prazo da RI e do DMII resultam de perda da sinalização da insulina e metabolismo alterado da glicose, incluindo neuropatia periférica, retinopatia, doença cardiovascular e falência renal (Mudaliar 2004). Perdas da memória e das funções executivas também acompanham o DMII (Ryan and Geckle 2000), especialmente em

adultos velhos (Awad, Gagnon et al. 2004). Mesmo na ausência de DM, a RI esta associada ao declínio acelerado das funções cognitivas (Messier, Awad et al. 2004). Fisiologicamente, a hiperinsulinemia esta ligada a distúrbios do metabolismo da glicose e sinalização da insulina, o que afeta várias regiões do cérebro, incluindo aquelas envolvidas na cognição (lobo frontal, hipocampo), as quais são regiões plausíveis de mediar os déficits cognitivos (Winocur, Greenwood et al. 2005).

O impacto do DM no SNC e bem reconhecido. Em humanos, DM esta associado com perda da função cognitiva, risco de isquemia, doença cerebrovascular e doença de Alzheimer (Saravia, Revsin et al. 2002). Muitos estudos sugerem que o risco de declínio cognitivo e neurodegeneração estão aumentados não somente no DM, mas também em pacientes com pré-diabetes ou SM (Luchsinger, Tang et al. 2004). Indivíduos com pré-diabetes são definidos como aqueles que apresentam glicemia de jejum alterada e/ou intolerância a glicose, o que aumenta o risco de desenvolvimento do DM (Yaffe, Blackwell et al. 2004).

A fisiopatologia exata da disfunção cognitiva e lesão cerebral no DM não e totalmente entendida, mas e provável que a hiperglicemia, doença vascular, hipoglicemia e RI desempenhem papel significativo (Kodl and Seaquist 2008). DM pode acelerar o processo de envelhecimento do cérebro, pois acelera a atrofia cerebral (Biessels, van der Heide et al. 2002), reduzindo a cognição e diminuindo o limiar para o desenvolvimento de sintomas de DA. Alem disso, a RI pode acelerar o envelhecimento biológico através da formação dos AGEs e conseqüente aumento dos Eros.

O consumo de dietas ricas em lipídios e açúcares pelas sociedades modernas tem sido associado com alterações metabólicas e perda das funções cerebrais (McGarry 2002; Molteni, Wu et al. 2004). Colantuoni e colaboradores (Colantuoni, Rada et al. 2002) demonstraram que excessivo e continuo consumo de açúcar leva a um comportamento de dependência e ansiedade quando os ratos são privados de açúcar.

Trabalho em nosso laboratório mostrou que ratos alimentados com dieta rica em açúcar, quando submetidos ao teste claro-escuro gastaram menos tempo no compartimento claro e apresentaram ao mesmo tempo maior numero de recusas de entrada no compartimento claro, e este comportamento segundo Gingrich (Gingrich 2005) e Hovatta et al., (Hovatta,

Tennant et al. 2005) e aceito como característica de ansiedade.

2. OBJETIVOS

A prevalência da obesidade e do Diabetes está aumentando rapidamente ao redor do mundo, e eles constituem fator de risco para várias outras desordens no sistema nervoso periférico e central. Levando em consideração estes aspectos e o fato do alto consumo de alimentos aquecidos e ricos em gorduras e carboidratos pelas sociedades modernas.

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral: avaliar o efeito da dieta hiperpalatável com e sem aquecimento sobre o sistema nervoso central dos ratos expostos à dieta por 4 meses, avaliando parâmetros metabólicos, neuroquímicos e comportamentais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliação de parâmetros metabólicos periféricos: glicemia, lipidemia e curva de tolerância à glicose;

2. Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo no SNC, particularmente hipocampo: conteúdo de glutathiona, grupos SH totais, atividade da SOD, dano oxidativo ao DNA;

3. Avaliação de parâmetros neuroquímicos, particularmente no hipocampo e hipotálamo: conteúdo de GFAP; metabolismo do glutamato (captação de glutamato e atividade da glutamina sintetase); captação de glicose; via de sinalização da insulina (conteúdo e fosforilação das proteínas IRS, Akt e PI3K);

4. Avaliação de parâmetros comportamentais (atividade locomotora, ansiedade e cognição).

Os resultados serão apresentados na forma de Artigos. O primeiro artigo contempla os objetivos específicos 1 e 3 (parcialmente); o artigo 2 (em preparação) contempla s objetivos 2 e 3. O objetivo 4 está parcialmente expresso no anexo 1 desta tese.

PARTE II

ARTIGOS

3. ARTIGO I

Alterations of PI3K and Akt signaling pathways in the hippocampus and hypothalamus of Wistar rats treated with highly palatable food

Cíntia E. Battú², Débora Rieger¹, Samanta Loureiro¹, Gabriel V. Furtado^{1,3}, Hugo Bock^{1,3}, Maria- Luiza Saraiva- Pereira^{1,3}, Regina Pessoa-Pureur¹, Carlos-Alberto Gonçalves^{1,2*}, Marcos-Luiz S. Perry^{1,2,†}

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ² Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ³ Laboratório de Identificação Genética, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Running head: Hippocampal PI3K changes by highly palatable food

† *In memoriam*

***Corresponding author:** Carlos Alberto Gonçalves

Departamento de Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos 2600 Anexo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003,

Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 5567

Fax: +55 51 3308 5540

E-mail: casg@ufrgs.br

Abstract

Background/Objectives: Highly-palatable food (HPF), which is enriched in simple sugars and saturated fat, contributes to obesity and insulin resistance in humans. These metabolic changes are associated with serious complications of the central nervous system, including an elevated risk of cognitive dysfunction. We, herein, treated rats with HPF and then examined the insulin-signaling pathway, in particular, the levels of PI3K, Akt and IRS-1 in the hippocampus and hypothalamus. **Methods:** Adult Wistar rats fed with HPF (heated or not during preparation) for 4 months and then measured the levels of PI3K, Akt and IRS-1 in the hippocampus and hypothalamus, by western blotting and quantitative real-time PCR. **Results:** We observed changes in body weight, glucose intolerance and lipemia, confirming that peripheral metabolic alterations were induced using this model. Hippocampal PI3K and hypothalamic Akt were affected in rats that are submitted to chronic exposure to a HPF diet. Moreover, heated HPF caused differentiated alterations in the regulatory subunit of PI3K in the hippocampus. **Discussion:** Our data suggest that this diet alters insulin signaling differentially in each brain region, and that hippocampal changes induced by this diet could contribute to the understanding of cognitive impairments that are dependent on the hippocampus.

Key words: Akt/PKB, cafeteria diet, highly palatable food, hippocampus, insulin resistance, PI3K, western style diet

Introduction

There is a growing appreciation for the role of highly-palatable food (HPF) in animal models of obesity and eating disorders. This kind of food contributes to weight gain, obesity and insulin resistance in humans (1, 2). HPF (also named junk food, cafeteria diet or western style diet) is enriched in simple sugars and saturated fat and consumed daily as snacks and/or calorie-dense meals that contain high amounts of fat and sucrose (3-5).

The insulin receptor is a protein with intrinsic tyrosine kinase activity that, following activation by insulin, undergoes rapid autophosphorylation. Subsequently, it phosphorylates intracellular protein substrates, including insulin receptor substrate (IRS) proteins 1 and 2. IRS-1 and IRS-2 activate several proteins, including phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). This, in turn, activates, among some downstream targets, the Akt/PKB pathway, which plays a pivotal role in the regulation of various biological processes, including apoptosis, proliferation, differentiation, and intermediary metabolism (6). The mechanisms of insulin resistance and its downstream molecular alterations are not yet understood, but possibly involve stress-induced serine/threonine phosphorylation of the IRS by mTOR (7), the inhibitor of kappa B kinase β (8) and c-Jun kinase (9) among others. Insulin resistance has also been reported in brain tissue and related to neurodegenerative disorders (10-13). Changes in the phosphorylation in both IRS-1 and 2 have been described in brain tissue in rat models of diabetes mellitus (14, 15).

Another set of important factors that play a role in insulin resistance and eating disorders are advanced glycation end-products (AGEs). These are produced by the nonenzymatic glycation of proteins, more commonly at lysine or arginine residues (16). AGEs are produced endogenously or obtained exogenously from food. The amount of AGEs in a food is dependent on its composition, the temperature and the time of preparation (17, 18). AGEs directly, or via receptor for AGEs (RAGE), could affect insulin signaling (19).

We therefore sought to evaluate whether insulin signaling is altered in the brain of rats that have been fed with HPF. We were particularly interested in two regions; the hypothalamus, a key region for feeding control (20), and the hippocampus, a region that is commonly involved in cognitive disorders, including diabetes mellitus (11, 21). The aim of

this study was to examine the insulin-signaling pathway (in particular, the content of PI3K, Akt/PKB and IRS-1, as well as their phosphorylation status) in the hippocampus and hypothalamus of adult male Wistar rats that had been fed with heated and non-heated HPF for 4 months.

Experimental procedure

Animals and diets. Thirty adult Wistar rats (male, 60 days old) were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry and maintained under a standard dark–light cycle (the lights remained on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.), at 22 °C. Our research protocols were in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Veterinary Medicine and Animal Science Faculty of the University of São Paulo, Brazil.

The rats were divided into three groups: (a) the control group (N = 10), which received standard laboratory rat chow (see Table 1); (b) the highly palatable food (HPF) group, (N = 10), which received a diet enriched in simple sugars and saturated fat (see Table 1); and (c) the heated highly palatable food (heated HPF) group (N = 10), which received the same diet as the HPF group, the food was heated at 130°C for 30 min, and a vitamin mixture was added after heating. During the treatment period (4 months), the animals had free access to food and water.

Chemicals. Tris, ethylenediaminetriacetic acid (EDTA), glycerol, Tween-20, acrylamide and bis-acrylamide were from Sigma (Sao Paulo, Brazil). The monoclonal antibodies: anti-PI3K (subunit p85), anti-PI3K (subunit p110), anti-IRS-1, anti-phospho-IRS-1 (Tyr 612), anti-Akt, and anti-phospho-Akt (Ser 473) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). The antibody, anti-phospho-IRS-1 (Ser 307), was purchased from Chemicon/Millipore (Sao Paulo, Brazil). Nitrocellulose, radiographic films, the ECL kit and the secondary antibodies were purchased from GE healthcare (Sao Paulo, Brazil). RNeasy[®] and TRI Reagent[®] solution were purchased from Applied

Biosystems (São Paulo, Brazil). Quant-iT™ RNA Assay kit was purchased from Invitrogen (São Paulo, Brazil). High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, TaqMan Gene Expression Master Mix reagent, TaqMan® Gene Expression Assays for Akt1, Irs1, Pik3ca and Pik3cg genes as well as TaqMan® GAPDH Endogenous Control were all purchased from Applied Biosystems (São Paulo, Brazil).

The preparation of the protein samples and the electrophoresis protocol. Dissected brain tissue was homogenized in lysis solution containing 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 4% (w/v) SDS. For electrophoresis, the samples were dissolved in 25% (v/v) of a solution containing 40% glycerol, 5% mercaptoethanol, and 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 and boiled for 4 min. The protein concentration was determined using bovine serum albumin as the standard (22). Equal protein concentrations were loaded (100 µg/well) onto a polyacrylamide gel for electrophoresis (10% SDS-PAGE) and resolved using the discontinuous system of Laemmli (23). *Western blot analysis.* The same amounts of protein samples (30 µg) were analyzed by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (using the Trans-blot SD semi-dry transfer cell, BioRad) for 1 h at 15 V in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol and 0.25% SDS). The nitrocellulose membranes were washed for 10 min in Tris-buffered saline (TBS; 0.5 M NaCl, 20 mM Trizma, pH 7.5) and blocked for 2 h in TBS containing 5% non-fat dried milk (M-TBS). The membranes were then incubated overnight at 4°C in the blocking solution containing, separately, the following polyclonal antibodies (1:1,000 dilution): anti-IRS-1, anti-phospho-IRS-1 (Tyr 612), anti-phospho-IRS-

1 (Ser 307), anti-Akt, anti-phospho-Akt (Ser 473), anti-PI3K-p85 and anti-PI3K p110. The blots were incubated for 2 h with anti-rabbit IgG (1: 2,000 dilution) conjugated with peroxidase, and immunoreactive bands were then developed using the ECL system. Standardization for each primary antibody evaluated sensitivity and linearity (from 5 to 50µg of protein sample). The immunoblots were quantified by scanning the films using a Hewlett-Packard Scanjet 6100C scanner, and the optical densities were measured using an Optiquant version 02.00 software (Packard Instrument Company) (24, 25).

mRNA isolation, cDNA synthesis and quantitative real-time PCR (qPCR) for PI3K-p85 and PI3K-p100. Tissues for RNA isolation were kept in RNALater® and total

RNA was isolated using TRI Reagent[®] solution, according to the manufacturer's protocol. RNA was quantitated using the Quant-iT[®] RNA Assay in the Qubit[™] (Invitrogen) equipment. cDNA was synthesized by reverse transcription (RT) reaction, using the High Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit. Before the gene expression assay, the cDNA solution was diluted 1:5 in nuclease-free water. mRNA expression was estimated by quantitative real time PCR (qPCR) using gene-specific TaqMan[®] FAM/MGB assays (Rn00435670_g1 assay for Pik3ca and Rn01769522_m1 assay for Pik3cg). Expression values of target genes were normalized by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression (Rn99999916_s1). Assays were carried out in triplicate and gene expression assays were purchased from Applied Biosystems (São Paulo, Brazil). Reactions were carried out in an ABI Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Target transcript relative expression levels were determined by the ddCt method (26).

Glucose Tolerance Test. A glucose tolerance test was carried out after four months of treatment with the diets. A 50% glucose solution was injected into the animals (i.p., 2 mg/kg) after 6 h of starvation. The blood was collected by a small puncture to the tail immediately before, and 30, 60, and 120 min after the injection. At each time-point, the level of glucose was measured using a glucometer (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA).

Preparation of the liver, adipose tissue and plasma samples. The rats were killed by decapitation, and their blood collected and centrifuged at 2500 x g for 10 min to yield the plasma fraction that was used for the biochemical analyses. The liver and the retroperitoneal and epididymal fat tissues were dissected and weighed. Liver tissue was used for glycogen extraction and the measurement of the triacylglycerol levels.

Measurement of hepatic and plasma biochemical parameters. The triacylglycerol (TAG) and free fatty acid (FFA) levels were measured using commercial kits (Labtest, MG, Brazil and Roche Diagnostics, Germany, respectively). For the glycogen measurements, each liver was cut into small slices (about 100 mg) and incubated with 30% KOH. After boiling for

20 min in a hot water bath, the glycogen was precipitated with 99% ethanol and determined using the colorimetric method of Krisman (27). *Statistical analysis.* Results are presented as the means \pm standard deviations, and were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple-range test. Glucose tolerance curve (Fig 5) was analyzed repeated measures ANOVA. The level of significance (p) that we used was < 0.05 .

Results

The levels of the two subunits of PI3K, p85 (the regulatory subunit) and p110 (the catalytic subunit) in HPF and heated HPF groups were measured as percentages relative to the control group. Interestingly, the HPF diet decreased the content of both subunits in the hippocampus (Fig. 1a e 1b) ($F_{(2, 18)} = 545,098$ and $p < 0.001$ and $F_{(2, 18)} = 892,484$ and $p < 0.001$, respectively). Moreover, when the heated HPF diet was used, the levels of the catalytic (p110) subunit decrease, but there was a significant increase in the regulatory (p85) subunit. However, no significant changes were observed in the levels of either subunit p85 (Fig 1c, $F_{(2, 18)} = 2,596$ and $p = 0.102$) or p110 (Fig 1d, $F_{(2, 18)} = 3,204$ and $p = 0.065$) in the hypothalamus of the rats that were fed with HPF (heated or not).

In order to evaluate whether the changes in levels of PI3K subunits in hippocampus were associated with changes in gene expression, we quantified mRNA for both proteins (Fig 2). Interestingly, PI3K p85 mRNA levels were reduced in rats that had been fed with HPF, whether heated or not (Fig 2a) ($F_{(2, 21)} = 10,831$ and $p = 0.001$). Moreover, no changes were observed in PI3K p110 mRNA levels in rats that were fed with HPF (Fig 2b) ($F_{(2, 21)} = 0,334$ and $p = 0.720$).

The total content of Akt/PKB ($F_{(2, 21)} = 3,080$ and $p = 0.067$) and the level of phosphorylation of this protein at Ser 473 ($F_{(2, 21)} = 2,689$ and $p = 0.091$) were not changed in the hippocampus of rats that had been fed with HPF (Fig 3a and 3b, respectively), whether heated or not. Conversely, in the hypothalamus, although the level of this protein was not affected by the HPF (whether heated or not) (Fig 3c, $F_{(2, 21)} = 2,787$ and $p = 0.084$), the level of Ser 473 phosphorylation decreased by $\sim 30\%$ (Fig 3d, $F_{(2, 21)} =$

125,219 and $p = 0.000$).

In the hippocampus, neither the total content (Fig 4a, $F_{(2, 18)} = 2,195$ and $p = 0.140$), nor the phosphorylation of IRS1 at Tyr-612 (Fig 4b, $F_{(2, 18)} = 3,352$ and $p = 0.06$) or at Ser-307 (Fig 4c, $F_{(2, 18)} = 3,342$ and $p = 0.06$), were altered by the HPF diet (whether heated or not). Similarly, no changes were observed in the hypothalamus of these rats (Fig. 4d, $F_{(2, 18)} = 3,328$ and $p = 0.06$); Fig 4e, $F_{(2, 18)} = 2.670$ and $p = 0.096$; and Fig 4f, $F_{(2, 18)} = 3,302$ and $p = 0.06$).

To evaluate the metabolic alterations that had occurred in the rats that had been fed on the HPF, we measured the glucose tolerance responses (Fig 5), the body and adipose tissue weights, and the triacylglycerol and free fatty acid levels in the plasma (Table 2). The glucose tolerance curve was clearly different in the heated HPF-treated rats ($F_{(6, 42)} = 3,260$, $p = 0.01$). The body and adipose tissue weights increased significantly at the end of the HPF treatment, whether the food had been heated or not. However, the free-fatty acid levels in the plasma were significantly higher when the HPF had been heated. Moreover, the rats that were treated with heated HPF had lower hepatic glycogen levels.

Discussion

PI3K pathway has an important and pervasive role in the central nervous system, involved from energetic metabolism (10) to synaptic plasticity (28). In fact, at the molecular level, insulin and leptin signaling converge at the point of activation of PI3K and this activation is not limited to brain energetic metabolism. Therefore, changes in the PI3K pathway, beyond energy homeostasis disorders, could be linked to the development of brain disorders (12).

This study demonstrated that rats exposed to a heated HPF diet for 4 months exhibit metabolic changes that are similar to those found in diabetes mellitus type 2. These include an increase in the amount of white adipose tissue, glucose intolerance, elevated free fatty acid levels in the serum, and lower levels of hepatic glycogen. The decrease in the levels of hepatic glycogen probably occurred due to the decreased expression of glucokinase

and alterations in the PI3K pathway.

AGEs could be mediating this effect, since they formed continuously under physiological conditions, but levels increased dramatically during hyperglycemia (an endogenous source) or following the consumption of heated, prepared foods that are rich in carbohydrates or lipids (an exogenous source) (17). Protein glycation can affect cell signaling by itself, or through the effects of the resulting AGEs. Consequently, cell communication and survival are affected (29-31). The activation of receptor for AGEs (RAGE) triggers many signaling mechanisms, including those mediated by PI3K. However, we have no data in this study about AGE content or RAGE activation in liver or other tissues.

Regardless of this, we found that the levels of PI3K (both the p85 and p110 subunits) were reduced in the hippocampus of rats that were fed the HPF diet, suggesting that this signaling pathway is decreased by this diet. Moreover, PI3K mRNA for the p85 subunit (but not for the p110 subunit) also decreased after HPF diet. This decrease, in turn, could affect many brain activities that are dependent on the hippocampus integrity (25, 26,32). In contrast, cultured kidney mesangial cells that had been exposed to AGEs (and other AGE receptor activators) exhibited an upregulated PI3K pathway (33). Interestingly, when our rats were fed heated HPF, we observed an increase in the levels of the PI3K regulatory subunit (p85). This increase could be a manifestation of insulin resistance (34), however p85 mRNA levels were lower in rats fed on the HPF diet, whether heated or not. Therefore, at this stage, the meaning of this increase in the p85 protein is unclear. However, the protein levels of the catalytic subunit are lower, and we cannot rule out the possibility that the final activity of PI3K is lower than in the control rats.

Another intriguing aspect is that rat hypothalamic PI3K was not affected by the HPF diet. Clearly, PI3K has different functional roles in these regions (35). However, the differences observed in this work could also reflect differentiated susceptibilities of the tissues to glycoxidant stress. Differentiated vascularization and the heterogeneity of the cell types and interconnections are responsible for the different susceptibilities of different brain regions to specific insults. For example, when diabetes mellitus is induced by streptozotocin, it affects the hypothalamus and the hippocampus in different ways (36). Therefore, it is conceivable that PI3K signaling in the hippocampus is more susceptible to

glycotoxicity than in the hypothalamus, in this model of metabolic disorder.

Our next step was to investigate the Akt protein, a downstream target of PI3K activation, in the hippocampus and the hypothalamus. In the hippocampus, no changes were observed in the amount of Akt or in the level of phosphorylation at Ser 473 of the Akt protein. Moreover, no change was observed in the amount of Akt in the hypothalamus of the rats that were fed on the HPF diet, whether heated or not. Unlike the situation for the hippocampus, however, the phosphorylation of Ser 473 was reduced. Phosphorylation at this site has been associated with the activation of Akt (34); these data suggest that the HPF diet caused a decrease in Akt activity in the hypothalamus, despite the fact that the levels of PI3K and Akt did not change. In agreement with these findings, methylglyoxal inhibited the level of insulin-stimulated phosphorylation of Akt in L6 muscle cells, without affecting the level of tyrosine phosphorylation of the insulin receptor (37).

Finally, we investigated the level of insulin substrate receptor 1 (IRS-1), an upstream activator of PI3K. The total amount of IRS-1 was unaltered after the HPF treatment in both the hippocampus and the hypothalamus. Moreover, no differences were found in the levels of phosphorylation at Tyr-307 and Tyr-612, which are involved in the inactivation and activation of IRS-1, respectively (38). These data indicate that both the amount and the activity of the IRS-1 protein are apparently more protected against the insult induced by this diet than are the further steps (PI3K and Akt) in the insulin-signaling pathway.

There is strong evidence in the literature regarding cognitive deficits in diabetic patients and experimental models of diabetes (24, 26). AGEs have been proposed as mediators involved in these conditions (see (24) for a review) and, in fact, brain changes have been observed in HPF-treated rats by many laboratories including ours (5, 24, 26, 39,40). However, in this particular study, we did not perform experiments to characterize cognitive deficit. Other limitation to be addressed in further studies, is to investigate whether mechanisms of activation of PI3K involve RAGE activation, as well as to investigate other downstream targets of PI3K (e.g. mTOR) (41) that also could be related to some behavioral changes observed in HPF-treated rats (40).

In summary, our data indicate that the PI3K pathway, in the hippocampus, and

Akt, in the hypothalamus, are affected in rats that have suffered chronic exposure to a HPF diet. Moreover, the heated HPF diet caused differentiated alterations in the regulatory subunit of PI3K. These data reinforce the idea that metabolic insult induced by HPF diet can affect PI3K/Akt-mediated signaling in brain tissue, which is related to energy metabolism, neurotransmission and synaptic plasticity. Thus, our results suggest that this diet alters insulin signaling differentially in each brain region and that the hippocampal changes induced by this diet could contribute to the knowledge regarding cognitive impairments that are dependent upon the hippocampus.

Acknowledgements. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00 and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

Table 1. Composition and caloric value of the control chow and highly palatable food - (HPF)

<u>Components</u>		Control ^a (%)	HPF (%)
Carbohydrate		62	57
	Starch	62	20.5
	Condensed milk ^b	0	16.5
	Sucrose	0	20
Fat		5	10
	Soybean oil	5	17.6
	Condensed milk	0	2.4
Protein		25	25
	Soybean ^c	25	22.7
	Condensed milk	0	2.3
Salt mixture^d		4	4
Vitamin mixture^e		1.5	1.5
Fibers		2.5	2.5
Caloric value	Kcal/g	3.9	4.1

^a Based on a standard commercial chow for rats from Nuvilab-CR1 (Curitiba, Brazil).

^b From Nestlé (São Paulo, Brazil)

^c From Solae (Esteio, Brazil) supplemented with 0.3% DL-Methionine and DL-Lysine (from Merck, Rio de Janeiro, Brazil)

^d Mineral mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100g of ration: NaCl, 557; KI, 3.2; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄.7H₂O, 108; MnSO₄.H₂O, 16; ZnSO₄.7H₂O, 2.2; CuSO₄.5H₂O, 1.9; CoCl₂.6H₂O, 0.09.

^e Vitamin mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100g of ration: Vitamin A, 4; Vitamin D, 0.5; Vitamin E, 10; Menadione, 0.5; Choline, 200; PABA 10; Inositol 10; Niacin, 4; Pantothenic acid, 4; Riboflavin, 0.8; Thiamin, 0.5; Pyridoxine, 0.5; Folic acid, 0.2; Biotin, 0.04; Vitamin B 12, 0.003.

Table 2. Body weight gain, white adipose tissue weight, lipidemia and hepatic lipid and glycogen of rats fed with HPF or heated HPF for 4 months.

	Control	HPF	heated HPF
Body weight gain (in g)	105 ± 23	128 ± 30 ^a	129 ± 38 ^a
White adipose tissue weight ^c (in g)	9.7 ± 1.4	20 ± 5.3 ^a	19 ± 4.6 ^a
Plasma			
Free fatty acid (μmol/L)	559 ± 97	588 ± 156	751 ± 160 ^b
Triacylglycerol (mg%)	130 ± 21	139 ± 42	186 ± 61 ^b
Liver			
Triacylglycerol (mg %, w/w)	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2
Glycogen (mg %, w/w)	5.8 ± 0.9	5.2 ± 0.9	2.4 ± 1.0 ^b

^a Significantly different from control; ^b Significantly different from control and HPF group (determined using one-way ANOVA, followed by Duncan's test $p < 0.05$);

^c Retroperitoneal and epididymal fat tissues.

References

1. Arola L, Bonet ML, Delzenne N et al., Summary and general conclusions/outcomes on the role and fate of sugars in human nutrition and health. *Obes Rev* 2009; 10 Suppl 1: 55-58.
2. Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT, Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr* 2000; 130: 284S-288S.
3. Yeomans MR, Blundell JE, Leshem M, Palatability: response to nutritional need or need-free stimulation of appetite? *Br J Nutr* 2004; 92 Suppl 1: S3-14.
4. Ovaskainen ML, Reinivuo H, Tapanainen H et al., Snacks as an element of energy intake and food consumption. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 494-501.
5. Dietrich MO, Muller A, Bolos M et al., Western style diet impairs entrance of blood-borne insulin-like growth factor-1 into the brain. *Neuromolecular Med* 2007; 9: 324-330.
6. !!! INVALID CITATION !!!
7. Gual P, Gremeaux T, Gonzalez T et al., MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* 2003; 46: 1532-1542.

8. Gao Z, Hwang D, Bataille F et al., Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 2002; 277: 48115-48121.
9. Aguirre V, Uchida T, Yenush L et al., The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 2000; 275: 9047-9054.
10. Gerozissis K, Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 38-49.
11. Gispen WH, Biessels GJ, Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 2000; 23: 542-549.
12. van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP, Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol* 2006; 79: 205-221.
13. Dou JT, Chen M, Dufour F et al., Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem* 2005; 12: 646-655.
14. Carvalheira JB, Ribeiro EB, Araujo EP et al., Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 2003; 46: 1629-1640.
15. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL et al., Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 2005; 146: 1576-1587.
16. Thornalley PJ, Dietary AGEs and ALEs and risk to human health by their interaction with the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)--an introduction. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1107-1110.
17. Sebekova K, Somoza V, Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects--PRO. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1079-1084.
18. de Assis AM, Rieger DK, Longoni A et al., High fat and highly thermolyzed fat diets promote insulin resistance and increase DNA damage in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234: 1296-1304.
19. Sato N, Takeda S, Uchio-Yamada K et al., Role of insulin signaling in the interaction between Alzheimer disease and diabetes mellitus: a missing link to therapeutic potential. *Curr Aging Sci* 4: 118-127.
20. Meister B, Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 2007; 92: 263-271.
21. Arushanyan EB, Beier EV, The hippocampus and cognitive impairments. *Neurosci Behav Physiol* 2008; 38: 751-758.
22. Peterson GL, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83: 346-356.
23. Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
24. Costa AP, Tramontina AC, Biasibetti R et al., Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behav Brain Res* 2011.
25. Moreira JD, Knorr L, Thomazi AP et al., Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats. *J Nutr Biochem* 2010; 21: 351-356.
26. Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
27. Krisman CR, A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine.

- Anal Biochem 1962; 4: 17-23.
28. Corominas M, Roncero C, Ribases M et al., Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology* 2007; 55: 2-13.
 29. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM et al., Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006; 114: 597-605.
 30. Stitt AW, Bhaduri T, McMullen CB et al., Advanced glycation end products induce blood-retinal barrier dysfunction in normoglycemic rats. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3: 380-388.
 31. Vlassara H, Fuh H, Makita Z et al., Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 12043-12047.
 32. Yi SS, Hwang IK, Yoo KY et al., Effects of treadmill exercise on cell proliferation and differentiation in the subgranular zone of the dentate gyrus in a rat model of type II diabetes. *Neurochem Res* 2009; 34: 1039-1046.
 33. Xu D, Kyriakis JM, Phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent activation of renal mesangial cell Ki-Ras and ERK by advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2003; 278: 39349-39355.
 34. Shepherd PR, Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand* 2005; 183: 3-12.
 35. Wada A, Yokoo H, Yanagita T et al., New twist on neuronal insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics. *J Pharmacol Sci* 2005; 99: 128-143.
 36. Beauquis J, Homo-Delarche F, Revsin Y et al., Brain alterations in autoimmune and pharmacological models of diabetes mellitus: focus on hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis disturbances. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 61-67.
 37. Riboulet-Chavey A, Pierron A, Durand I et al., Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes* 2006; 55: 1289-1299.
 38. Bloch-Damti A, Potashnik R, Gual P et al., Differential effects of IRS1 phosphorylated on Ser307 or Ser632 in the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Diabetologia* 2006; 49: 2463-2473.
 39. Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR et al., Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sci* 2007; 81: 198-203.
 40. Muller AP, Tort AH, Gnoatto J et al., Metabolic and behavioral effects of chronic olanzapine treatment and cafeteria diet in rats. *Behav Pharmacol* 2010; 21: 668-675.
 41. Hoeffler CA, Klann E, mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 2010; 33: 67-75.

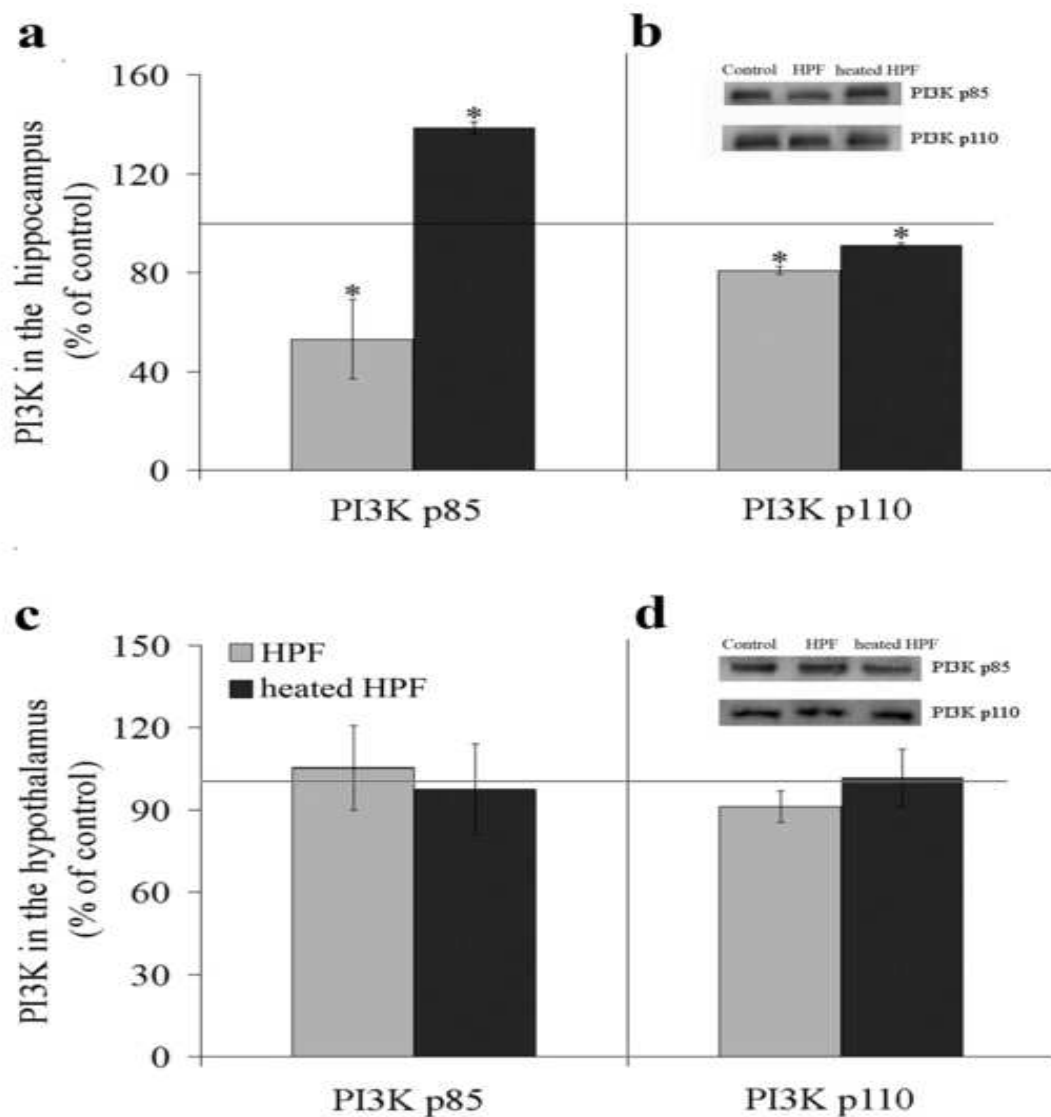


Figure 1. The effect of HPF and heated HPF on the levels of PI3K in the hippocampus and hypothalamus of rats. Adult Wistar rats received a HPF or heated HPF diet for 4 months. The hippocampus (panels a and b) and hypothalamus (c and d) were dissected out, and the samples were resolved on SDS-PAGE. Immunoblots that tested for the p85 (a and c) or p110 (b and d) subunits of PI3K were developed using ECL reagents. The luminescent bands were scanned and quantified using Optiquant software. The results from the animals that were fed with the HPF and heated HPF diets are represented by the gray and black bars, respectively. The results are expressed as a percentage of the control group (assumed as 100%). Representative immunoblots are shown in the inset. The values shown are the means (\pm S.D.) of 7-9 rats from each group. * Significantly different from the respective control in each panel (one way ANOVA followed by Duncan's test, assuming $p < 0.05$).

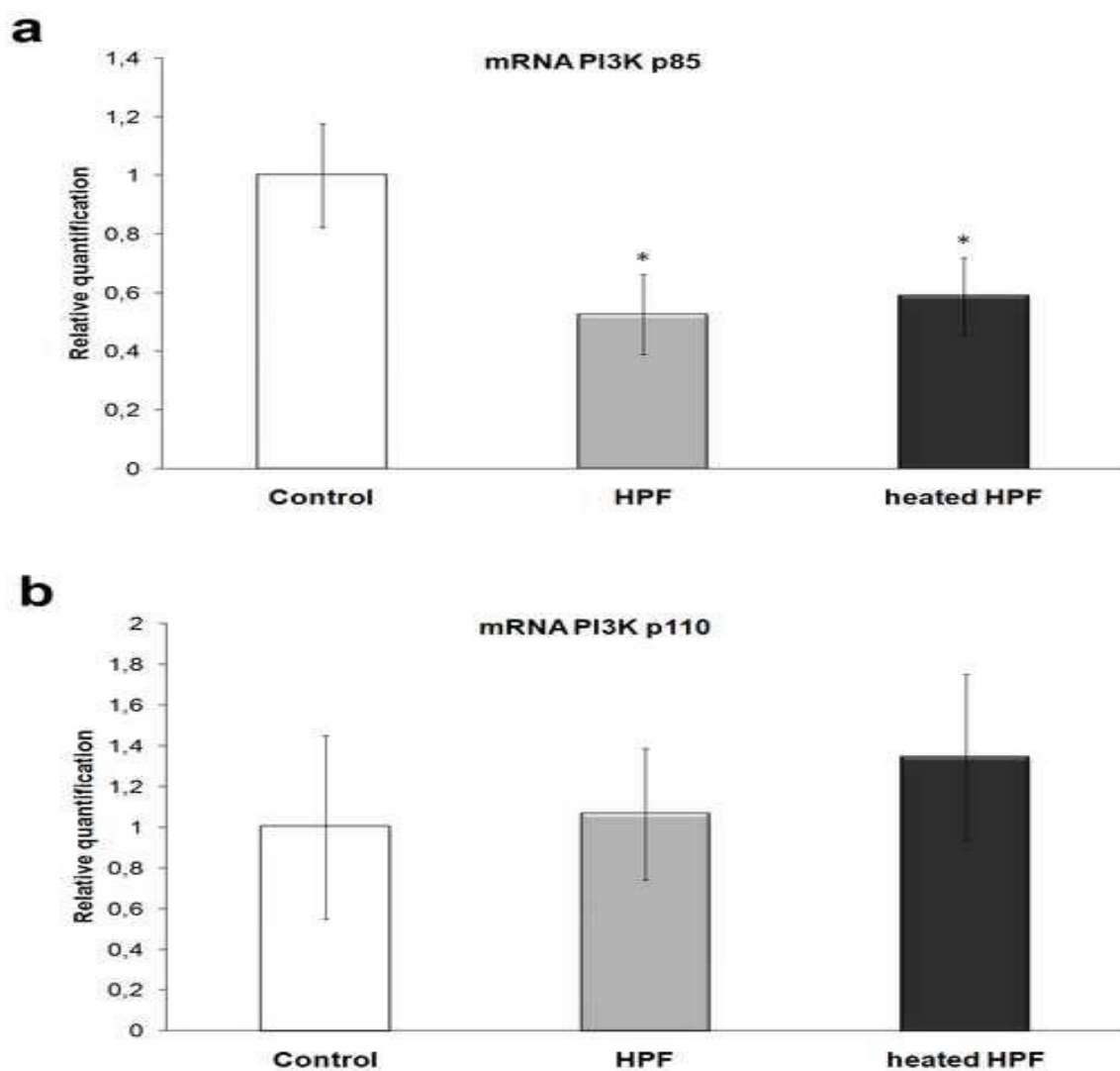


Figure 2. The effect of HPF and heated HPF on the relative expression of PI3K subunits in the hippocampus. Adult Wistar rats received a HPF or heated HPF diet for 4 months. mRNA isolation and quantitative real-time PCR (qPCR) for PI3K-p85 (Panel a) and PI3K-p100 (Panel b) were performed as described in Material and Methods. The values shown are the means (\pm S.D.) of 7-9 rats from each group. Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as an endogenous control. * Significantly different from the respective control in each panel (determined using one-way ANOVA, followed by Duncan's test, $p < 0.05$)

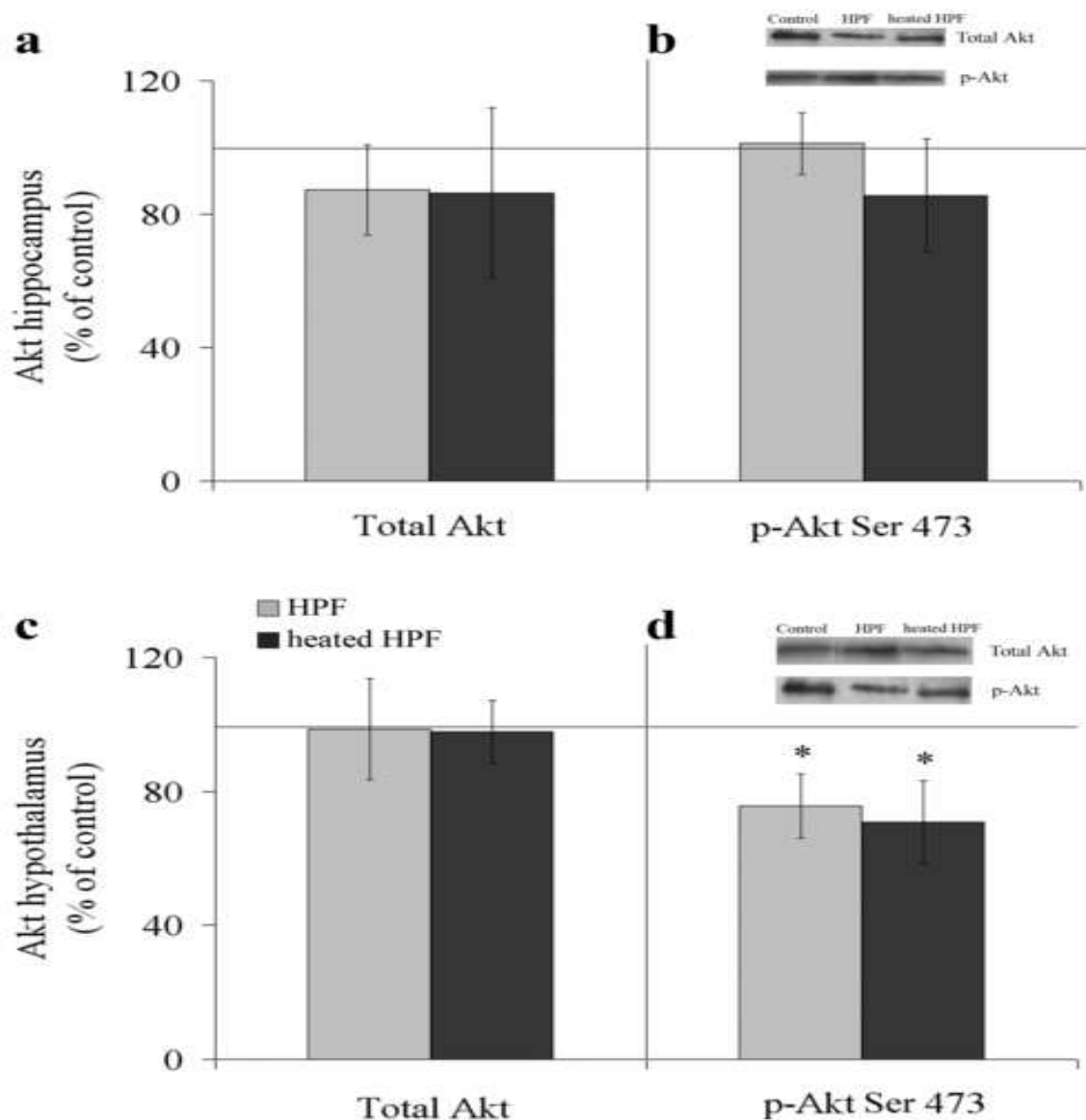


Figure 3. *The effect of HPF and heated HPF on the levels of Akt and phosphorylated-Akt in the hippocampus and hypothalamus of rats.* Adult Wistar rats received a HPF or heated HPF diet for 4 months. The hippocampus (panels a and b) and hypothalamus (c and d) were dissected out, and the samples were resolved on SDS-PAGE. Immunoblots that tested for Akt content (a and c) or phospho-Akt (phosphorylated at Ser-473) (b and d) were developed using ECL reagents. The luminescent bands were scanned and quantified using Optiquant software. The results from the animals that were fed with the HPF and heated HPF diets are represented by the gray and black bars, respectively. Results are expressed as percentages of the control group. Representative immunoblots are shown in the inset. * Significantly different from the respective control in each panel (determined using one-way ANOVA, followed by Duncan's test, $p < 0.05$)

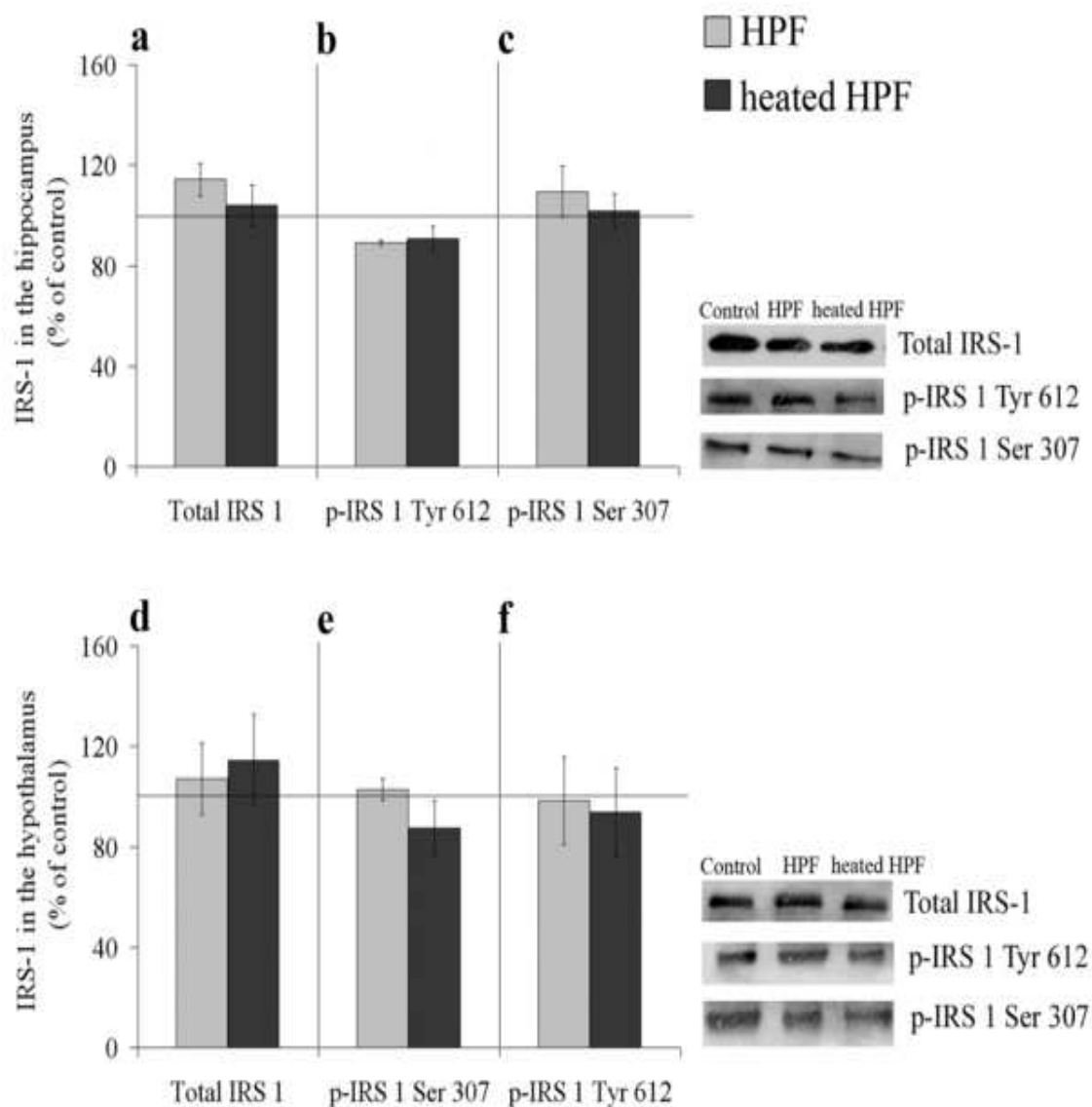


Figure 4. The effect of HPF and heated HPF on levels of IRS-1 in the hippocampus and hypothalamus of rats. Adult Wistar rats received a HPF or heated HPF diet for 4 months. The hippocampus (panels a, b and c) and hypothalamus (d, e and f) were dissected out, and the samples were resolved on SDS-PAGE. Immunoblots that tested for total IRS-1 (a and c) or phosphorylated IRS 1 (p-IRS 1) at Ser 307 (b and e), or at Tyr 612 (c and f), were developed using ECL reagents. The luminescent bands were scanned and quantified using Optiquant software. The results from the animals that were fed with the HPF and heated HPF diets are represented by the gray and black bars, respectively. The results were expressed as percentages of the control group. Representative immunoblots are shown in the inset. The values shown are the means (\pm S.D.) of 8-10 rats from each group. No significant differences were found between groups in each panel (determined using one-way ANOVA, followed by Duncan's test, $p < 0.05$).

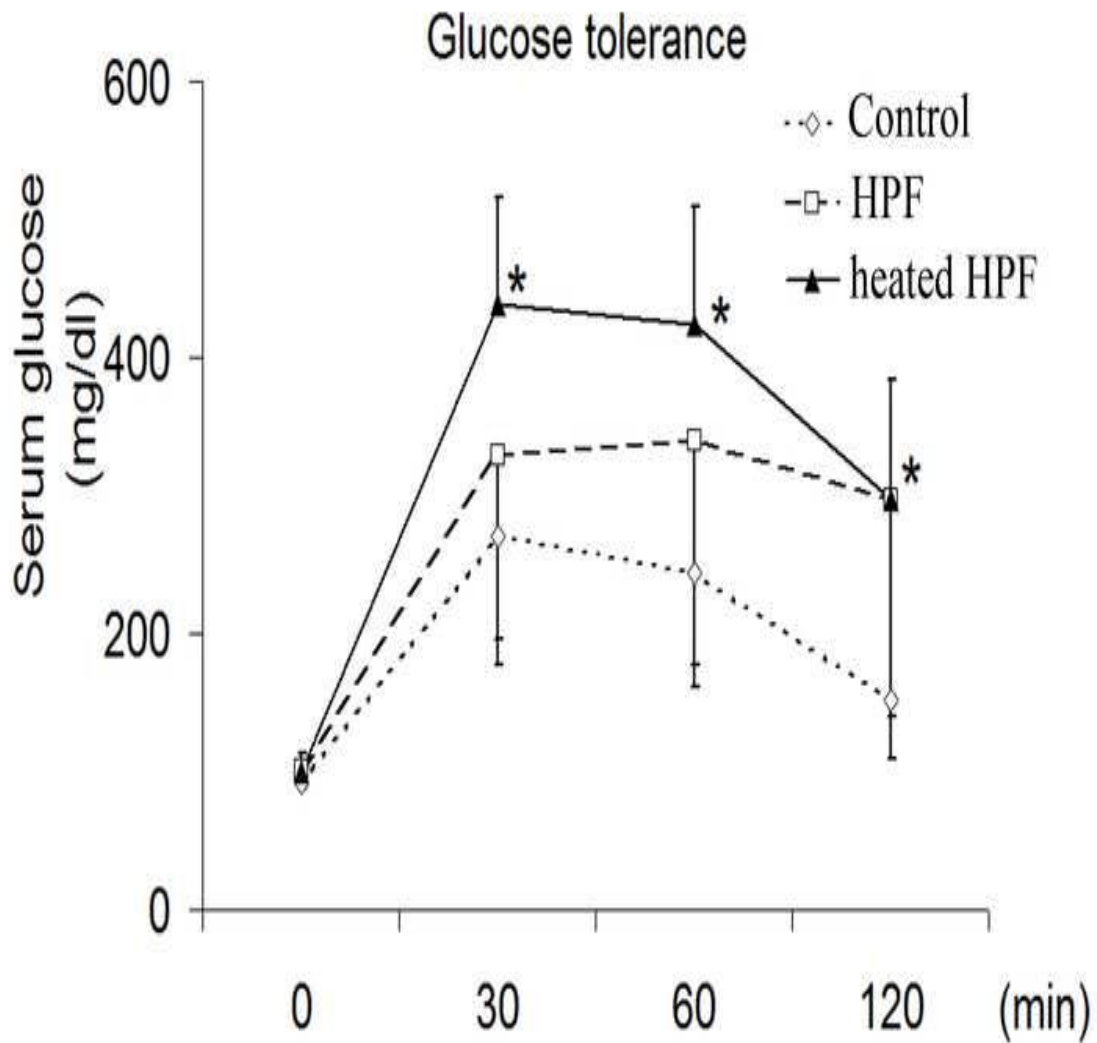


Figure 5. Glucose tolerance test in rats fed with HPF or heated HPF. Adult Wistar rats received a HPF or heated HPF diet for 4 months. At the end of the treatment, glucose was administered intraperitoneally (2 mg/kg). The blood was collected by a small puncture in the tail immediately before, and 30, 60, and 120 min after, the injection. The values of glycemia are the means \pm S.D. of 8-10 rats from each group. * Significantly different from the respective control (determined by repeated measures analysis of variance, assuming $p < 0.05$).

4. ARTIGO II

Dieta hiperpalatável induz aumento de GFAP, dano oxidativo ao DNA e altera a captação do glutamato em ratos Wistar

Cíntia E Battú¹, Débora R Venske², Cristiane Denardin², Cristina Andreazza², Carlos Alberto Gonçalves^{1,2}, Marcos Luiz Perry^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

(Manuscrito em preparação a ser submetido ao periódico Neurochemical Research)

Introdução

Está bem estabelecido o papel das dietas hiperpalatáveis (HPF) em modelos animais de obesidade e desordens alimentares. Além disso, sabemos que alimentos quando aquecidos produzem maior quantidade de produtos finais de glicação avançada (AGEs), mais do que isso, sabe-se que a principal fonte de AGEs pré-formados são as dietas ricas em carboidratos e lipídios, processadas com aquecimento.

AGEs são um grupo heterogêneo de compostos gerados via múltiplas vias *in vivo*, incluindo redução de açúcares, reação espontânea de ascorbato e outros carboidratos com amino-peptídeos, lipídeos e ácidos nucleicos (Peppas, Uribarri et al. 2002). AGEs estão envolvidos com condições de aumento do estresse oxidativo. O acúmulo de AGEs e produtos relacionados são importantes no desenvolvimento das complicações do diabetes (Thorpe et al., 1996; Ulrich e Cerami, 2001).

O impacto do diabetes mellitus no sistema nervoso central (SNC) é bem reconhecido. Em humanos, o diabetes está associado com perda cognitiva, risco de isquemia, desordens cerebrovasculares e Alzheimer, além de alterações morfológicas como atrofia de áreas corticais e sub-corticais (Biessels, Kappelle et al. 1994; Gispen and Biessels 2000).

Pronunciadas alterações patológicas também caracteriza o cérebro de animais diabéticos, particularmente o hipocampo. Estudos mostram alterações pré e pós-sinápticas, desregulação da homeostase do cálcio, perda neuronal, atrofia dendrítica em neurônios de CA3, expressão reduzida de fator de crescimento da insulina e seus receptores e diminuição da neurogênese (Jackson-Guilford, Leander et al. 2000; Magarinos and McEwen 2000; Li, Zhang et al. 2002; Saravia, Revsin et al. 2004). No hipocampo de camundongos diabéticos, estudos mostram hiperatividade da NADPH- diarforase/óxido nítrico sintase e astrócitos do estrato radiatum (Saravia, Revsin et al. 2004; Revsin, Saravia et al. 2005). Esta encefalopatia seletiva pode ser explicada em parte pelos efeitos neurotóxicos da hiperglicemia, por alterações na transmissão glutamatérgica, e concomitante estresse oxidativo (Flood, Baker et al. 1990; Chabot, Massicotte et al. 1997) em áreas cerebrais com alto grau de plasticidade como o hipocampo.

Uma das prováveis causas de dano ao hipocampo em nível celular é o

desenvolvimento de estresse oxidativo com formação de radicais livres. Formas ativas de oxigênio molecular (acúmulo de superóxido e radicais peróxidos, etc) são conhecidas, em certas circunstâncias, por adquirirem propriedades tóxicas e acarretarem diretamente a morte celular em várias estruturas, incluindo o hipocampo. Isto ocorre como resultado da peroxidação lipídica (PL), fragmentação do ADN, e ruptura do equilíbrio entre enzimas pró e antioxidantes em favor da formação de radicais (Piotrowski, Wierzbicka et al. 2001).

Tem-se demonstrado que as células gliais participam de um grande número de atividades cerebrais, tanto em condições normais quanto patológicas. Elas exercem um particular e proeminente papel em processos de reparo, respondendo a todas as formas de insultos ao SNC (Arushanyan and Beier 2008). As células astrogliais tornam-se reativas (astroglíose) após alguns insultos, aumentando a síntese de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), principal proteína de citoesqueleto dos astrócitos, resultando em hipertrofia do soma, espessos e prolongados processos da GFAP, analisados por imunohistoquímica (Sofroniew 2005; Wilhelmsson, Bushong et al. 2006; Arushanyan and Beier 2008).

Anormalidades astrocitárias têm sido observadas em hipocampo durante o estresse, envelhecimento, doenças auto-imunes e degenerativas, e também em modelos de diabetes em ratos, induzidos por estreptozotocina (STZ) (Sharma, Zimmer et al. 1992; Lambert, Gerecke et al. 2000). Nos ratos, dano ao hipocampo, causando hiperreatividade ao estresse e envolvendo tanto neurônios quanto astrócitos, tem sido observado (Magarinos and McEwen 2000). Portanto, astrócitos parecem ser um dos principais alvos durante homeostase anormal da glicose, incluindo hiper e hipoglicemia.

Diabetes mellitus, independente do tipo, está associada com alterações cerebrais em humanos e modelos animais desta desordem (Biessels, van der Heide et al. 2002). Estas alterações incluem expressão anormal de neuropeptídeos hipotalâmicos (Gispén and Biessels 2000), astroglíose hipocampal (Saravia, Revsin et al. 2002), diminuição da plasticidade sináptica hipocampal (Magarinos and McEwen 2000; Saravia, Gonzalez et al. 2001), neurotoxicidade, e mudanças na neurotransmissão glutamatérgica (Chabot, Massicotte et al. 1997; Gardoni, Kamal et al. 2002; Valastro, Cossette et al. 2002). Estudos prévios encontraram em dois diferentes modelos de diabetes tipo 1, aumento no número de GFAP-reativa em astrócitos no hipocampo estriado radium (Saravia, Revsin et al. 2002).

Com base nestes dados acima descritos, nós alimentamos ratos Wistar com dieta hiperpalatável e hiperpalatável aquecida durante 4 meses. Posteriormente, analisamos alguns parâmetros de estresse oxidativo, dano ao DNA, metabolismo glutamatérgico e imunoconteúdo da GFAP.

Materiais e métodos

Animais e dieta. Trinta ratos Wistar adultos (machos, 60 dias de idade), provenientes do Biotério Central do Departamento de Bioquímica foram mantidos em ciclo claro-escuro (12h cada), a temperatura ambiente constante de 22°C. O protocolo desta pesquisa está de acordo com as exigências do Comitê sobre os cuidados e uso de animais experimentais do departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os animais foram divididos em três grupos: (a) grupo controle (C, n=10), o qual recebeu dieta padrão do biotério (50% de carboidratos, 22% de proteínas e 4% de lipídeos); (b) dieta hiperpalatável (HPF, n=10), o qual recebeu dieta semi-sólida contendo 22% de proteínas, 55% de carboidratos (33% na forma de leite condensado) e 4,5% de lipídeos); e (c) dieta hiperpalatável aquecida (heated HPF, n=10), o qual recebeu a mesma dieta que o grupo 2, porém aquecida a 130°C, durante 30 minutos, sendo a mistura vitamínica adicionada após o aquecimento (Holemans, Caluwaerts et al. 2004). Durante o período de tratamento (4 meses), os animais tiveram livre acesso a ração e água.

Ensaio cometa. O protocolo padrão do ensaio cometa foi realizado segundo Tice (Tice, Agurell et al. 2000). Fatias de hipocampo foram utilizadas para este ensaio. Estas fatias foram homogeneizadas em PBS gelado (pH 7,4). 20 µL deste homogenato foram adicionados a gel de agarose de baixo ponto de fusão (0,75). A mistura (células/agarose) foi adicionada a uma lâmina de microscópio totalmente fosca revestida com uma camada de 300 µL de gel de agarose de ponto de fusão normal (1%). Após solidificação, as lâminas foram cuidadosamente removidas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com recém-adicionado 1% Triton X-100 e dimetil sulfóxido 10% [DMSO]) durante a noite. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em

tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 12,6) por 20 minutos. As amostras foram submetidas a eletroforese por 20 minutos em 25V (0,90V/cm) e 300mA, em condições alcalinas (pH>13). Após, neutralizou-se as lâminas três vezes durante 5 minutos com 0,4M de tris (pH 7,5). Finalmente, o DNA foi corado com brometo de etídio. Controles negativos e positivos foram utilizados para cada ensaio de eletroforese para assegurar a confiabilidade do processo. Imagem de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células a partir de 2 lâminas), foram analisadas a partir de cada animal. As células foram marcadas visualmente de acordo com o tamanho da cauda em cinco classes, de ausência de cauda (0), ao tamanho máximo (4). Portanto o índice de quebras poderia variar de 0 (todas as células sem cauda) a 400 (todas as células com cauda longa) (Gedik and Collins 2005).

Atividade antioxidante.

Superóxido dismutase. A atividade da superóxido dismutase foi avaliada através da quantificação da inibição da superóxido dependente da auto-oxidação da adrenalina, em espectrofotômetro a 480 nm, como descrito anteriormente (Misra and Fridovich 1972).

Captação de glutamato. A captação de glutamato foi realizada a partir de Thomazi (Thomazi, Godinho et al. 2004). Resumidamente, após período de estabilização das fatias hipocâmpais foi adicionado 0,66 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$ L-[^3H] glutamato com 100 mM de glutamato não radioativo por 5 minutos em uma solução salina de Hank equilibrado (HBSS), contendo em mM: 137 NaCl; 0,63 Na_2HPO_4 ; NaHCO_3 4,17; 5,36 KCl, KH_2PO_4 0,44; 1,26 CaCl_2 , MgSO_4 0,41, 0,49 e 1,11 MgCl_2 glicose, em pH 7,2. A absorção sódio-independente foi determinada utilizando N-metil-D-glucamina no lugar de cloreto de sódio. A captação de glutamato sódio-dependente foi obtida pela subtração da captação não-específica do total, para obtermos a captação específica. O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por Peterson (Peterson 1977) e da radioatividade incorporada foi medida em contador de cintilação líquida Wallac 1409.

Glutamina sintetase. A atividade da glutamina sintetase foi determinada de acordo com Petit et al. (Petit, Chung et al. 1992). 0,1 mL de homogenato de hipocampo (1/10, p/v em 0,15 M de KCl gelado) foi incubado por 15 minutos a 37°C em 0,2 mL de uma

mistura contendo 10 mM de MgCl₂, 50 mM de L-glutamato, 100 mM de tampão HCl-imidazol (pH7,4), 10 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mM de HCl-hidroxilamina e 10 mM de ATP. A reação foi interrompida pela adição de 0,8 mL de uma solução contendo 0,37 M de cloreto férrico, 0,67 M de HCl e 0,2 M de ácido tricloacético. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante lido a 530nm. Uma solução de γ -glutamilhdroxamato e cloreto férrico foi utilizada como padrão. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Peterson (Peterson 1977). A atividade da glutamina sintetase foi expressa em μ mol/Mg de proteína/h.

Preparação das amostras para eletroforese. As amostras de hipocampo foram homogeneizadas em solução contendo 2 mM de EDTA, 50 mM de tris-HCl, pH 6,8 e 4% de SDS (p/v). Para eletroforese, as amostras foram dissolvidas em 25% de uma solução contendo 40% de glicerol, 5% de mercaptoetanol, 50 mM de tris-HCl, pH 6,8 e fervidas durante 4 minutos. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), usando albumina bovina como padrão. As concentrações de proteínas foram equalizadas (100 μ g/poço) e aplicadas no gel de poliacrilamida (10% SDS-PAGE) e analisados de acordo com Laemmli (Laemmli 1970).

Western Blotting. Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Trans-blot SD, BioRad), por 1 h e em 15 V, em tampão de transferência (48 mM trizma, 39 mM de glicina, metanol 20% e SDS 0,25%). As membranas foram então lavadas em solução salina tamponada com tris (TBS; 0,5 M NaCl, 20 mM trizma, pH 7,5) e bloqueadas por 2 h com TBS contendo 5% de leite em pó sem gordura (M-TBS). Após o bloqueio as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos com TBS mais 0,05% de Tween-20 (T-TBS), e em seguida incubadas durante a noite a 4°C em solução bloqueadora contendo o anticorpo (diluído 1/500): anti-GFAP. As membranas foram então lavadas três vezes por 5 minutos com T-TBS e incubados por 2 h em M-TBS contendo anticorpo IgG anti-mouse (1:2000) conjugado a peroxidase. As membranas foram lavadas novamente 2 vezes por 5 minutos com T-TBS e 2 vezes por 5 minutos com TBS e posteriormente as bandas foram visualizadas utilizando ECL. As bandas foram quantificadas pela digitalização dos filmes com scanner Scanjet 6100C Hewlett-Packard e as densidades ópticas com uma versão do software Optiquant 02.00 (Packard Instrument Company).

Análise estatística. Os dados dos experimentos foram apresentados como média \pm desvio padrão e analisados por meio da análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Duncan, assumindo o nível de significância (p), como $<0,05$.

Resultados

Após 4 meses de dieta a presença de estresse oxidativo foi indicada pelo aumento da atividade da SOD na dieta HPFh (Figura 1) e pelo aumento da quantidade de grupos tiólicos não protéicos (dados não mostrados). O dano ao DNA em hipocampo foi avaliado pelo ensaio Cometa. Foram vistas alterações significativas nos animais tratados com a dieta HPFh (Figura 2).

Dois parâmetros foram analisados para avaliar o metabolismo hipocampal do glutamato: a captação de glutamato (Figura 3) e a atividade da glutamina sintetase (Figura 4). A captação de glutamato mostrou-se aumentada no hipocampo de animais tratados com dieta hiperpalatável aquecida, mas não encontramos diferença significativa na dieta hiperpalatável não aquecida. A atividade da glutamina sintetase não mostrou diferença significativa com o grupo controle.

Finalmente, analisamos o imunoconteúdo de GFAP no hipocampo dos ratos. Observamos que em ambas as dietas o imunoconteúdo de GFAP mostrou-se aumentado, indicando a presença de astrogliose (Figura 5a,b).

Discussão

Está bem estabelecido que as dietas hiperpalatáveis são modelos eficazes de diabetes mellitus tipo2, e que o aquecimento destas dietas leva ao aumento da produção dos AGE. Os AGE podem causar mudanças patológicas nos tecidos por dois mecanismos gerais: formar ligações cruzadas covalentes que alteram a estrutura e função de proteínas ou interagir com receptores de superfície celular, dando início a eventos intracelulares que induzem o estresse oxidativo e inflamação (Eble, Thorpe et al. 1983; Vlassara 2001). Os AGE têm

receptores específicos, mas como também são geradores de espécies reativas de oxigênio (ROS), eles podem ativar sinais independente dos receptores. Os produtos de glicoxidação podem acelerar a geração de radicais livres, estresse oxidativo e carbonilação (Miyata, Ishikawa et al. 2003).

Estudos têm relacionado o consumo de dietas ocidentais com aumento do estresse oxidativo (Diniz, Fernandes et al. 2004; Ghosh, Kewalramani et al. 2006; Milagro, Campion et al. 2006; Roberts, Won et al. 2006; Bullo, Casas-Agustench et al. 2007) e o aquecimento destas dietas aumenta a formação de AGEs, aumentando a produção de radicais livres e estresse oxidativo em modelos animais.

Além disso, é demonstrado que dietas com alto teor de lipídeos ou altamente calóricas aumentam a geração de radicais livres no encéfalo de roedores (Zhang, Komine-Kobayashi et al. 2005). Os níveis elevados de glicose sanguínea têm sido considerados uma importante fonte de produção de radicais livres em indivíduos intolerantes a glicose (Brownlee 2005), uma vez que altos níveis de glicose bloqueiam o fluxo de elétrons da cadeia de transporte, gerando níveis elevados de superóxido (Nishikawa, Edelstein et al. 2000; Brownlee 2005).

Em nosso estudo encontramos indicadores de estresse oxidativo representados pelo aumento da atividade da SOD e das quantidades de grupos tiólicos não protéicos nos animais tratados com a dieta HPFh. O aumento na atividade da SOD indica a presença de grandes quantidades de radical superóxido e a tentativa da enzima removê-lo (Aydin, Orhan et al. 2001).

O ensaio cometa, em condições alcalinas, detecta quebras simples e duplas na fita de DNA (Tice, Agurell et al. 2000). A ruptura do DNA pode ser causada por nucleases ativadas por Ca^{2+} e/ou ROS, principalmente OH^\cdot , formado pela reação de H_2O_2 com íons metal ligados ao ADN (Darley-Usmar and Halliwell 1996). Quando a produção de ROS ultrapassa a capacidade do sistema oxidante celular, o estresse oxidativo ocorre, o que leva a danos oxidativos a biomoléculas, incluindo DNA (Lovell and Markesbery 2007). Livre acesso a dieta hiperpalatável aumentou as rupturas do DNA no hipocampo (figura 2). Esta mesma dieta induziu aumento do dano ao DNA em hipotálamo e estriado (ANEXO IV).

Diabetes mellitus tipo 1 e 2 resulta em deficiência da insulina e/ou resistência a insulina, hiperglicemia e altera o metabolismo lipídico, dos carboidratos e das proteínas. Ambos os tipos de diabetes afetam o SNC e estão associados ao aumento de epilepsia, acidente vascular cerebral, déficit cognitivo e demência (Whiting and Smith 1997; Ott 1999; Biessels, Koffeman et al. 2006; Biessels, Deary et al. 2008; Tiehuis, van der Graaf et al. 2008). Estas patologias surgem a partir de mudanças no metabolismo cerebral, reatividade vascular e aumento do estresse oxidativo (Mankovsky, Metzger et al. 1996; Horani and Mooradian 2003; Valko, Leibfritz et al. 2007). Os astrócitos exercem papel importante no metabolismo energético encefálico, na manutenção da barreira hemato-encefálica, na regulação dos níveis de glutamato extracelular, e proteção contra ROS, entre outras funções (Tsacopoulos and Magistretti 1996; Dringen 2000; Zonta, Angulo et al. 2003). Estas observações nos levam a supor que a atividade astrocitária alterada contribui para a fisiopatologia do SNC associadas ao diabetes.

Anormalidades astrocitárias no hipocampo têm sido observadas durante o estresse, envelhecimento, doenças auto-imunes e degenerativas e modelo de diabetes induzida por STZ em ratos (Landfield 1978; Lambert, Gerecke et al. 2000). Nestes animais, danos hipocampais, causando hiper-reatividade ao estresse e que envolvem tanto neurônios quanto astrócitos tem sido observados (Bestetti and Rossi 1980; Magarinos and McEwen 2000). Portanto, os astrócitos parecem ser um dos principais alvos em potencial durante a homeostase da glicose, incluindo hiper e hipoglicemia. A gliose reativa é frequentemente relacionada a doenças neurodegenerativas e do envelhecimento, nas quais disfunção neuronal ou danos podem ser encontrados (Eng and Ghirnikar 1994; Magistretti and Pellerin 1999).

Saravia e colaboradores encontraram previamente, em dois modelos de diabetes tipo I aumento na quantidade de GFAP em astrócitos no stratum radiatum do hipocampo (Saravia, Revsin et al. 2002). Estes modelos animais incluem camundongos diabéticos não obesos (NOD), os quais desenvolvem espontaneamente a doença, e, portanto, facilita análises pré e pós o desenvolvimento do diabetes. Outro modelo muito estudado é o modelo de diabetes induzido por STZ, no qual se estudas as alterações após o desenvolvimento da doença. Utilizando camundongos não obesos e camundongos C57BL/6 (tratados com STZ), foi encontrado aumento nas células GFAP+ e depois de 8 semanas aumento na imunorreatividade para GFAP.

Em nosso estudo, observamos aumento no imunoconteúdo de GFAP após 4 meses de tratamento com a dieta hiperpalatável aquecida ou não aquecida. Como o tratamento utilizado neste trabalho foi longo, podendo ser chamado de um tratamento crônico, gostaríamos de inferir que este aumento no imunoconteúdo da GFAP pode ser um processo adaptativo, pois este é um mecanismo de plasticidade bem estabelecido em hipocampo.

Alterações nas funções dos astrócitos também podem contribuir para os danos oxidativos associados ao diabetes (Bhardwaj, Sharma et al. 1998; Rosen, Nawroth et al. 2001; Mastrocola, Restivo et al. 2005). Os astrócitos são componente integral do sistema de defesa antioxidante encefálica, através da regulação das concentrações de glutamato extracelular e da produção de compostos antioxidantes (Dringen 2000; Trendelenburg and Dirnagl 2005). Um aumento significativo no estresse oxidativo, que causa danos aos tecidos, faz parte dos sintomas do diabetes (Rosen, Nawroth et al. 2001; Mastrocola, Restivo et al. 2005). Elevados níveis extracelulares de glutamato foram observados em indivíduos diabéticos, e o aumento na concentração de glutamato pode contribuir para a produção de ROS (Ambati, Chalam et al. 1997; Hansson, Muyderman et al. 2000).

A regulação extracelular do glutamato pelos astrócitos ocorre por mecanismos de captação sódio-dependente e sódio-independente (Danbolt 2001). Cinco transportadores de alta afinidade, sódio-dependente já foram clonados: GLAST/EAAT1, GLT1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 E EAAT5 (Rothstein, Martin et al. 1994; Gegelashvili and Schousboe 1998; Danbolt 2001). Os transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT1 são localizados principalmente nos astrócitos e têm papel crítico na manutenção dos níveis de glutamato extracelular, em níveis seguros (Danbolt 2001). A captação de glutamato sódio-independente pelo transportador-xc nos astrócitos está diretamente ligado a um trocador glutamato-cistina, e produção de glutathione (Dringen 2000; La Bella, Valentino et al. 2007).

Depois de 4 meses de tratamento com as dietas HPF e HPFh, nós encontramos aumento na captação de glutamato em hipocampo, mas não encontramos diferença significativa na atividade da enzima glutamina sintetase (enzima responsável pela metabolização de glutamato em glutamina nos astrócitos).

Coleman e colaboradores (Coleman, Dennis et al. 2010) encontraram na captação de glutamato em vesícula plasmalemal glial (GPV) isoladas de cérebro total de ratos tratados

com STZ. Este mesmo estudo não encontrou diferença no imunoconeúdo de GLT1 e GLAST em hipocampo, cerebelo e córtex cerebral, porém Coleman encontrou diminuição no imunoconteúdo de GFAP, ao contrário de nosso estudo. Mas podemos sugerir que a diferença na quantidade da proteína GFAP pode ser devido a diferenças nos modelos utilizados, pois nós trabalhamos com um modelo crônico de diabetes tipo II induzido por dieta, ao contrário do modelo induzido por STZ, que atua diretamente nas células beta-pancreática, mimetizando o diabetes tipo I. Estes trabalhos mostram diferenças na expressão da GFAP, dependendo do modelo utilizado.

A partir destes resultados podemos concluir que a dieta hiperpalatável é um excelente modelo para estudar as alterações causadas pelo diabetes tipo 2 no SNC. Encontramos aumento no dano ao DNA no hipocampo dos animais, bem como sinais de estresse oxidativo, especialmente na dieta aquecida. Além disso, foram encontrados sinais de gliose reativa pelo aumento imunoconteúdo em GFAP e alterações no metabolismo do glutamato, ambas envolvidos em doenças do SNC. Por conseguinte, podemos inferir que a condição de estresse de animais diabéticos pode aumentar a vulnerabilidade das áreas do cérebro com um elevado grau de plasticidade, tais como o hipocampo.

Referências

- Ambati, J., K. V. Chalam, et al. (1997). "Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy." Arch Ophthalmol 115(9): 1161-1166.
- Arushanyan, E. B. and E. V. Beier (2008). "The hippocampus and cognitive impairments." Neurosci Behav Physiol 38(8): 751-758.
- Aydin, A., H. Orhan, et al. (2001). "Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control." Clin Biochem 34(1): 65-70.
- Bestetti, G. and G. L. Rossi (1980). "Hypothalamic lesions in rats with long-term streptozotocin-induced diabetes mellitus. A semiquantitative light- and electron-microscopic study." Acta Neuropathol 52(2): 119-127.
- Bhardwaj, S. K., M. L. Sharma, et al. (1998). "Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver, and kidney." Mol Chem Neuropathol 34(2-3): 157-168.
- Biessels, G. J., I. J. Deary, et al. (2008). "Cognition and diabetes: a lifespan perspective." Lancet Neurol 7(2): 184-190.
- Biessels, G. J., A. C. Kappelle, et al. (1994). "Cerebral function in diabetes mellitus." Diabetologia 37(7): 643-650.

- Biessels, G. J., A. Koffeman, et al. (2006). "Diabetes and cognitive impairment. Clinical diagnosis and brain imaging in patients attending a memory clinic." J Neurol 253(4): 477-482.
- Biessels, G. J., L. P. van der Heide, et al. (2002). "Ageing and diabetes: implications for brain function." Eur J Pharmacol 441(1-2): 1-14.
- Brownlee, M. (2005). "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism." Diabetes 54(6): 1615-1625.
- Bullo, M., P. Casas-Agustench, et al. (2007). "Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet." Public Health Nutr 10(10A): 1164-1172.
- Chabot, C., G. Massicotte, et al. (1997). "Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats." Brain Res 768(1-2): 249-256.
- Coleman, E. S., J. C. Dennis, et al. (2010). "Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration." Brain Res 1306: 131-141.
- Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol 65(1): 1-105.
- Darley-Usmar, V. and B. Halliwell (1996). "Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system." Pharm Res 13(5): 649-662.
- Diniz, Y. S., A. A. Fernandes, et al. (2004). "Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue." Food Chem Toxicol 42(2): 313-319.
- Dringen, R. (2000). "Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration." Eur J Biochem 267(16): 4903.
- Ebbeling, C. B., K. B. Sinclair, et al. (2004). "Compensation for energy intake from fast food among overweight and lean adolescents." JAMA 291(23): 2828-2833.
- Eble, A. S., S. R. Thorpe, et al. (1983). "Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of protein." J Biol Chem 258(15): 9406-9412.
- Eng, L. F. and R. S. Ghirnikar (1994). "GFAP and astrogliosis." Brain Pathol 4(3): 229-237.
- Flood, J. F., M. L. Baker, et al. (1990). "Modulation of memory processing by glutamic acid receptor agonists and antagonists." Brain Res 521(1-2): 197-202.
- Gardoni, F., A. Kamal, et al. (2002). "Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats." J Neurochem 80(3): 438-447.
- Gedik, C. M. and A. Collins (2005). "Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study." FASEB J 19(1): 82-84.
- Gegelashvili, G. and A. Schousboe (1998). "Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters." Brain Res Bull 45(3): 233-238.
- Ghosh, S., G. Kewalramani, et al. (2006). "Induction of mitochondrial nitrate damage and cardiac dysfunction by chronic provision of dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids." Free Radic Biol Med 41(9): 1413-1424.
- Gispén, W. H. and G. J. Biessels (2000). "Cognition and synaptic plasticity in diabetes

- mellitus." Trends Neurosci 23(11): 542-549.
- Hansson, E., H. Muyderman, et al. (2000). "Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication." Neurochem Int 37(2-3): 317-329.
- Hill, J. O., E. L. Melanson, et al. (2000). "Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity." J Nutr 130(2S Suppl): 284S-288S.
- Holemans, K., S. Caluwaerts, et al. (2004). "Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus." Am J Obstet Gynecol 190(3): 858-865.
- Horani, M. H. and A. D. Mooradian (2003). "Effect of diabetes on the blood brain barrier." Curr Pharm Des 9(10): 833-840.
- Jackson-Guilford, J., J. D. Leander, et al. (2000). "The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus." Neurosci Lett 293(2): 91-94.
- La Bella, V., F. Valentino, et al. (2007). "Expression and developmental regulation of the cystine/glutamate exchanger (xc-) in the rat." Neurochem Res 32(6): 1081-1090.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Lambert, K. G., K. M. Gerecke, et al. (2000). "Activity-stress increases density of GFAP-immunoreactive astrocytes in the rat hippocampus." Stress 3(4): 275-284.
- Landfield, P. W. (1978). "An endocrine hypothesis of brain aging and studies on brain-endocrine correlations and monosynaptic neurophysiology during aging." Adv Exp Med Biol 113: 179-199.
- Li, Z. G., W. Zhang, et al. (2002). "Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes." Brain Res 946(2): 221-231.
- Lovell, M. A. and W. R. Markesbery (2007). "Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease." J Neurosci Res 85(14): 3036-3040.
- Macdiarmid, J. I., J. E. Cade, et al. (1996). "High and low fat consumers, their macronutrient intake and body mass index: further analysis of the National Diet and Nutrition Survey of British Adults." Eur J Clin Nutr 50(8): 505-512.
- Magarinos, A. M. and B. S. McEwen (2000). "Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress." Proc Natl Acad Sci U S A 97(20): 11056-11061.
- Magistretti, P. J. and L. Pellerin (1999). "Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 354(1387): 1155-1163.
- Mankovsky, B. N., B. E. Metzger, et al. (1996). "Cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus." J Diabetes Complications 10(4): 228-242.
- Mastrocola, R., F. Restivo, et al. (2005). "Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats." J Endocrinol 187(1): 37-44.
- Milagro, F. I., J. Campion, et al. (2006). "Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress." Obesity (Silver Spring) 14(7): 1118-1123.

- Misra, H. P. and I. Fridovich (1972). "The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin." J Biol Chem 247(21): 6960-6962.
- Miyata, T., N. Ishikawa, et al. (2003). "Carbonyl stress and diabetic complications." Clin Chem Lab Med 41(9): 1150-1158.
- Nishikawa, T., D. Edelstein, et al. (2000). "Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage." Nature 404(6779): 787-790.
- Ott, B. R. (1999). "Cognition and behavior in patients with Alzheimer's disease." J Genet Specif Med 2(3): 63-69.
- Peppas, M., J. Uribarri, et al. (2002). "Advanced glycoxidation. A new risk factor for cardiovascular disease?" Cardiovasc Toxicol 2(4): 275-287.
- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." Anal Biochem 83(2): 346-356.
- Petito, C. K., M. C. Chung, et al. (1992). "Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat." Brain Res 569(2): 275-280.
- Piotrowski, P., K. Wierzbicka, et al. (2001). "Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants." Folia Neuropathol 39(3): 147-154.
- Revsin, Y., F. Saravia, et al. (2005). "Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes." Brain Res 1038(1): 22-31.
- Roberts, C. K., D. Won, et al. (2006). "Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men." Diabetes Res Clin Pract 73(3): 249-259.
- Rosen, P., P. P. Nawroth, et al. (2001). "The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society." Diabetes Metab Res Rev 17(3): 189-212.
- Rothstein, J. D., L. Martin, et al. (1994). "Localization of neuronal and glial glutamate transporters." Neuron 13(3): 713-725.
- Saravia, F., Y. Revsin, et al. (2004). "Oestradiol restores cell proliferation in dentate gyrus and subventricular zone of streptozotocin-diabetic mice." J Neuroendocrinol 16(8): 704-710.
- Saravia, F. E., S. L. Gonzalez, et al. (2001). "Diabetes increases the expression of hypothalamic neuropeptides in a spontaneous model of type I diabetes, the nonobese diabetic (NOD) mouse." Cell Mol Neurobiol 21(1): 15-27.
- Saravia, F. E., Y. Revsin, et al. (2002). "Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice." Brain Res 957(2): 345-353.
- Sharma, H. S., C. Zimmer, et al. (1992). "Acute systemic heat stress increases glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in brain: experimental observations in conscious normotensive young rats." Neuroscience 48(4): 889-901.
- Tiehuis, A. M., Y. van der Graaf, et al. (2008). "Diabetes increases atrophy and vascular lesions on brain MRI in patients with symptomatic arterial disease." Stroke 39(5): 1600-1603.

- Trendelenburg, G. and U. Dirnagl (2005). "Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning." Glia 50(4): 307-320.
- Tsacopoulos, M. and P. J. Magistretti (1996). "Metabolic coupling between glia and neurons." J Neurosci 16(3): 877-885.
- Valastro, B., J. Cossette, et al. (2002). "Up-regulation of glutamate receptors is associated with LTP defects in the early stages of diabetes mellitus." Diabetologia 45(5): 642-650.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol 39(1): 44-84.
- Vlassara, H. (2001). "The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications." Diabetes Metab Res Rev 17(6): 436-443.
- Whiting, W. L. t. and A. D. Smith (1997). "Differential age-related processing limitations in recall and recognition tasks." Psychol Aging 12(2): 216-224.
- Wilhelmsson, U., E. A. Bushong, et al. (2006). "Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury." Proc Natl Acad Sci U S A 103(46): 17513-17518.
- Zhang, N., M. Komine-Kobayashi, et al. (2005). "Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain." Stroke 36(10): 2220-2225.
- Zonta, M., M. C. Angulo, et al. (2003). "Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation." Nat Neurosci 6(1): 43-50.

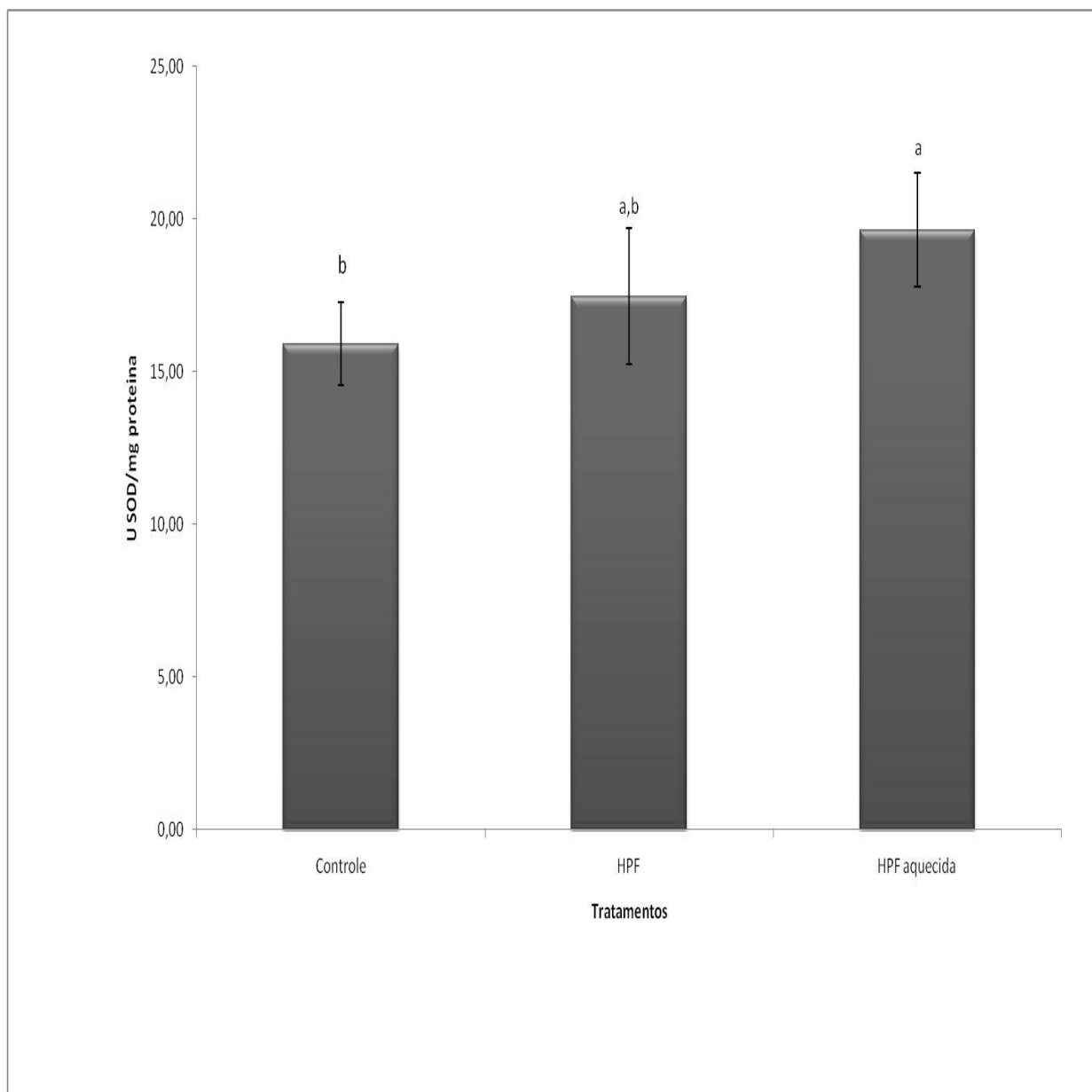


Figura 1. Análise da atividade da superóxido dismutase em hipocampo de ratos tratados com as dietas HPF e HPFh . Os hipocampos dos ratos tratados com a dieta aquecida durante 4 meses apresentaram maior atividade da SOD, sugerindo maior quantidade de radicais livres. A letra a na coluna representa que na dieta HPFh a atividade da SOD está aumentada em relação ao controle, enquanto que na dieta HPF as letras a,b mostram que não há diferença entre esta dieta e controle nem a dieta HPFh. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Significância $p < 0,05$ ($n = 8$).

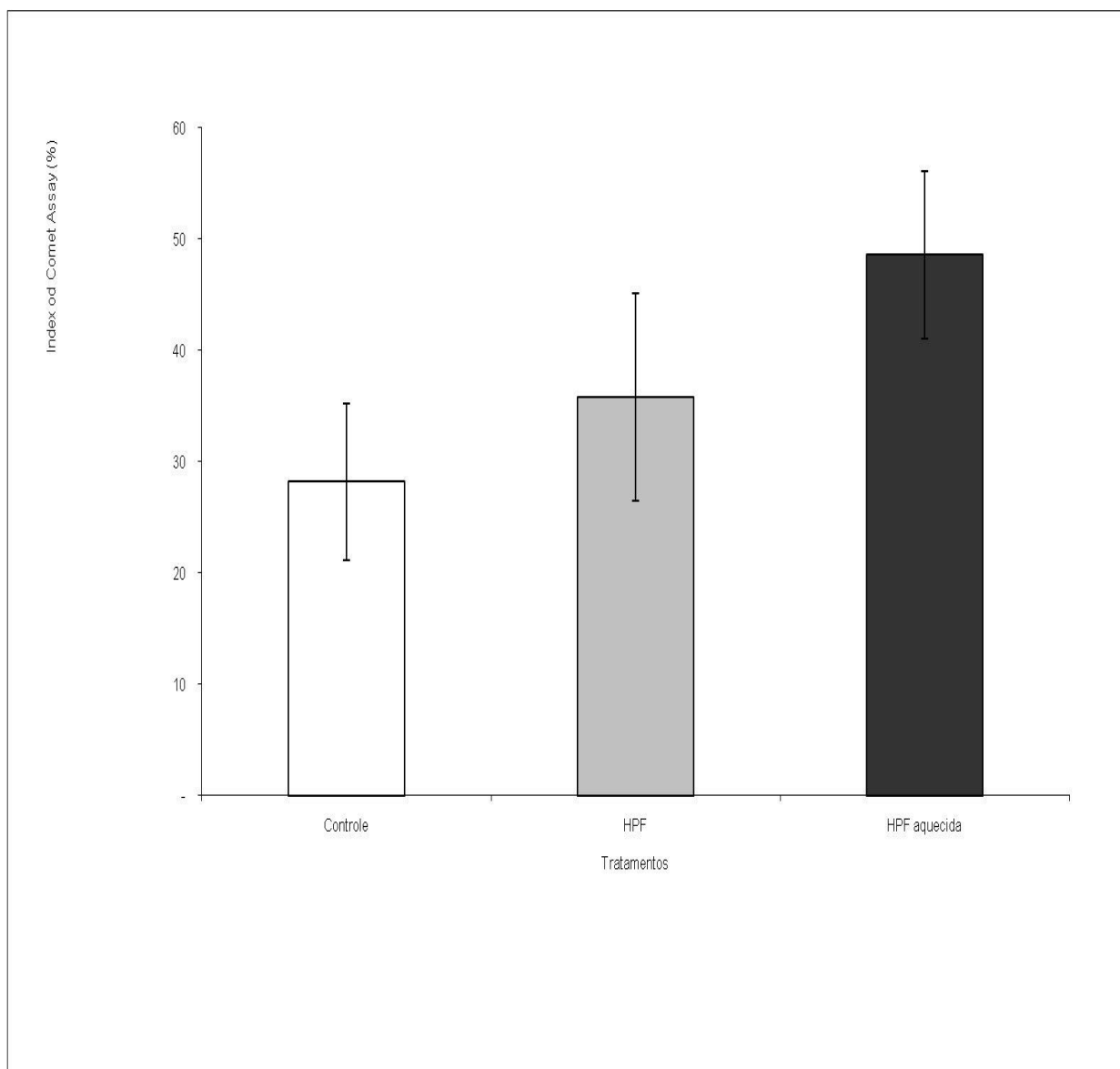


Figura 2. Quebras do DNA em hipocampo. Este ensaio foi avaliado pelo ensaio cometa, após tratamento de 4 meses com as dietas HOPF e HPFh. Os hipocampos dos animais tratados com a dieta aquecida apresentaram maior número de quebras no I a μ . A letra a na coluna que representa os animais que receberam a dieta HPFh mostra que o dano ao DNA está aumentado nesta dieta em relação ao controle a,b mas não encontramos alterações significativas na dieta HPF (a,b). Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Significância $p < 0,05$, $n = 9$.

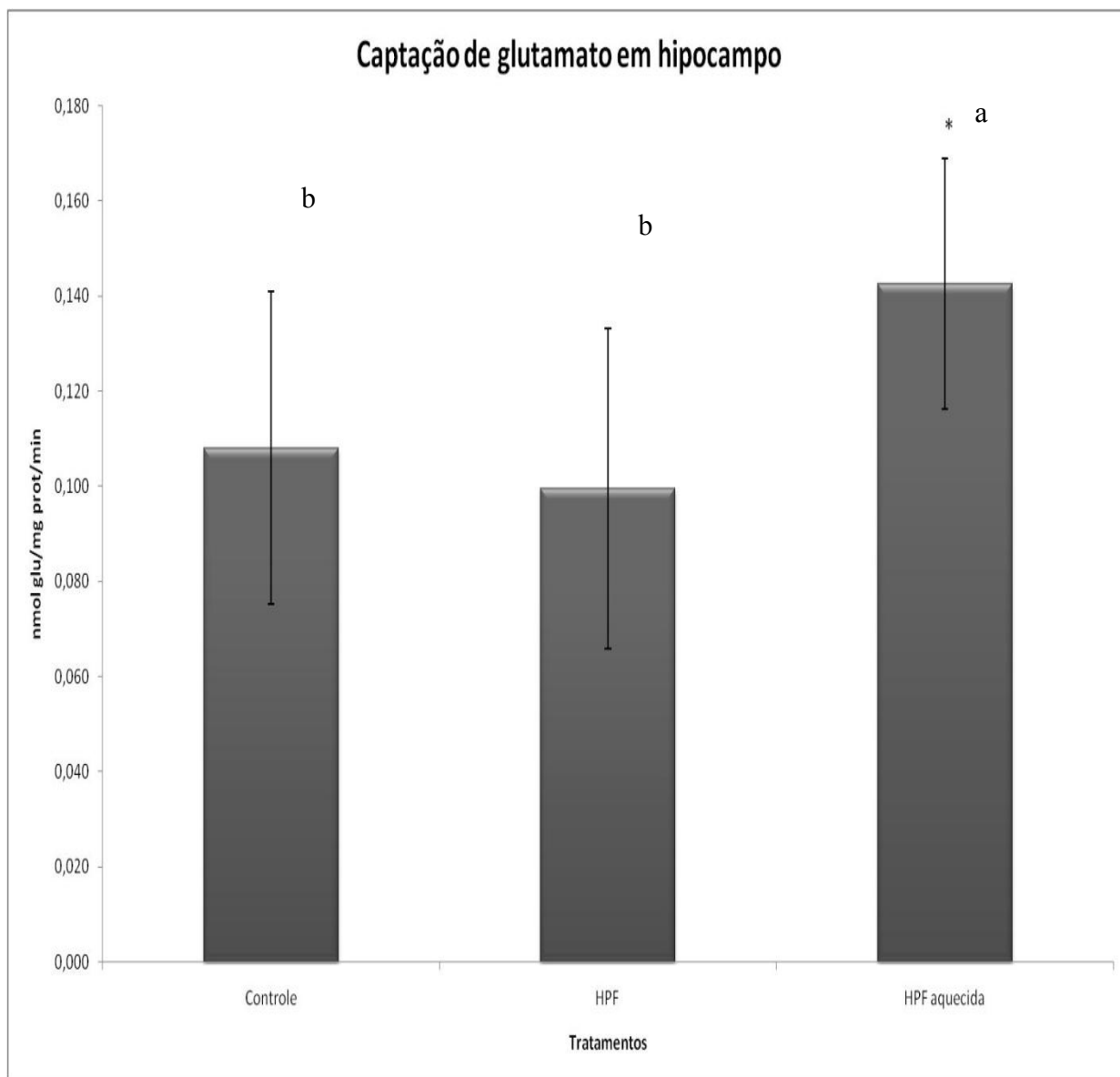


Figura 3. Captação de glutamato no hipocampo. Os ratos foram tratados durante 4 meses com as dietas HPF e HPFh. A captação de glutamato mostrou-se maior somente nos animais tratados com a dieta aquecida. A letra a na coluna representando os animais que receberam a dieta HPFh mostra que a captação de glutamato está aumentada em relação aos demais grupos (b). Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Significância $p < 0,05$ ($n = 12$).

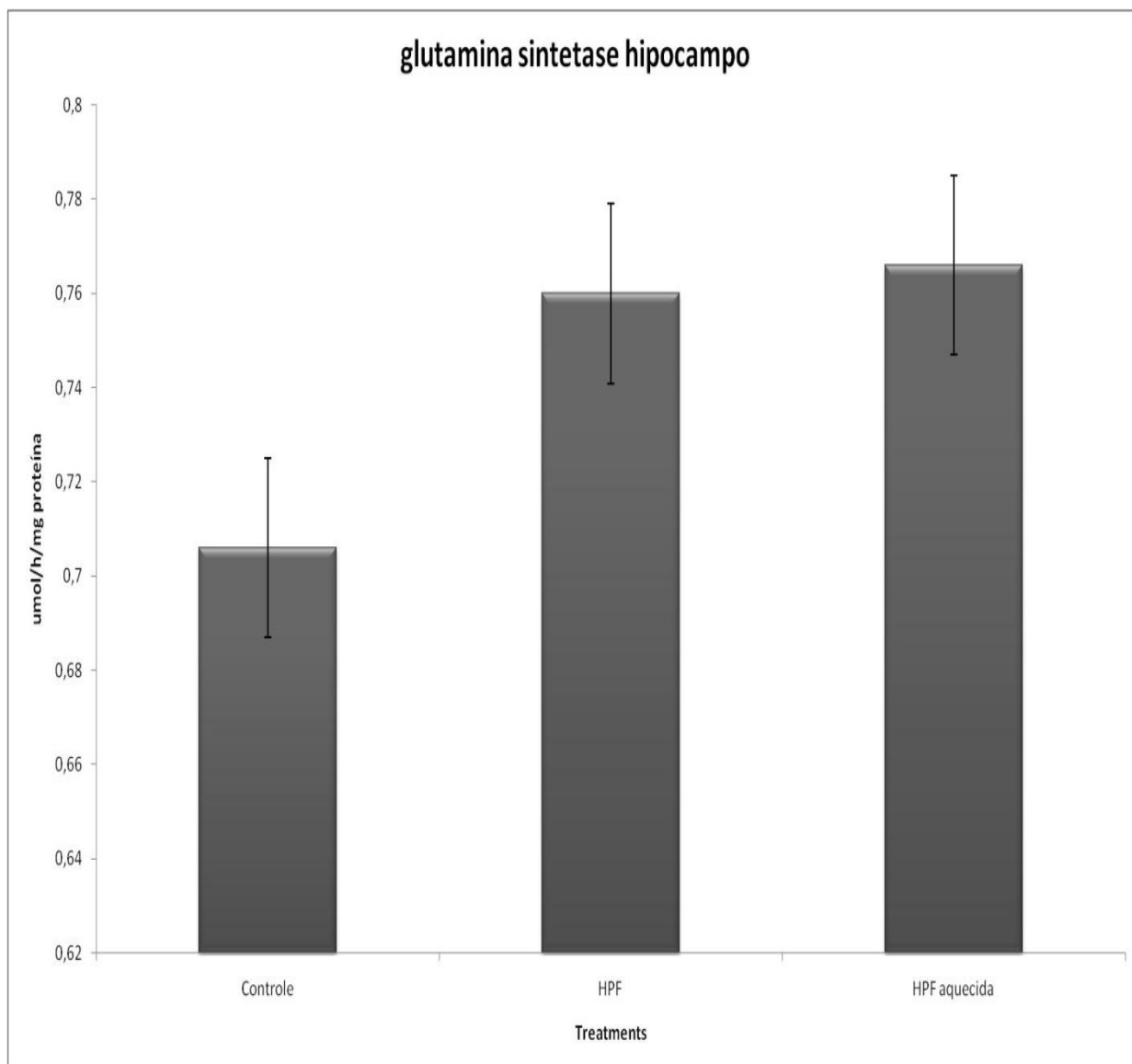


Figura 4. Atividade da enzima glutamina sintetase no hipocampo. Os ratos foram tratados durante 4 meses com as dietas HPF e HPFh. Não encontramos diferenças na atividade da enzima em nenhuma das dietas. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Significância $p < 0,05$ ($n = 9$).

a)



b)

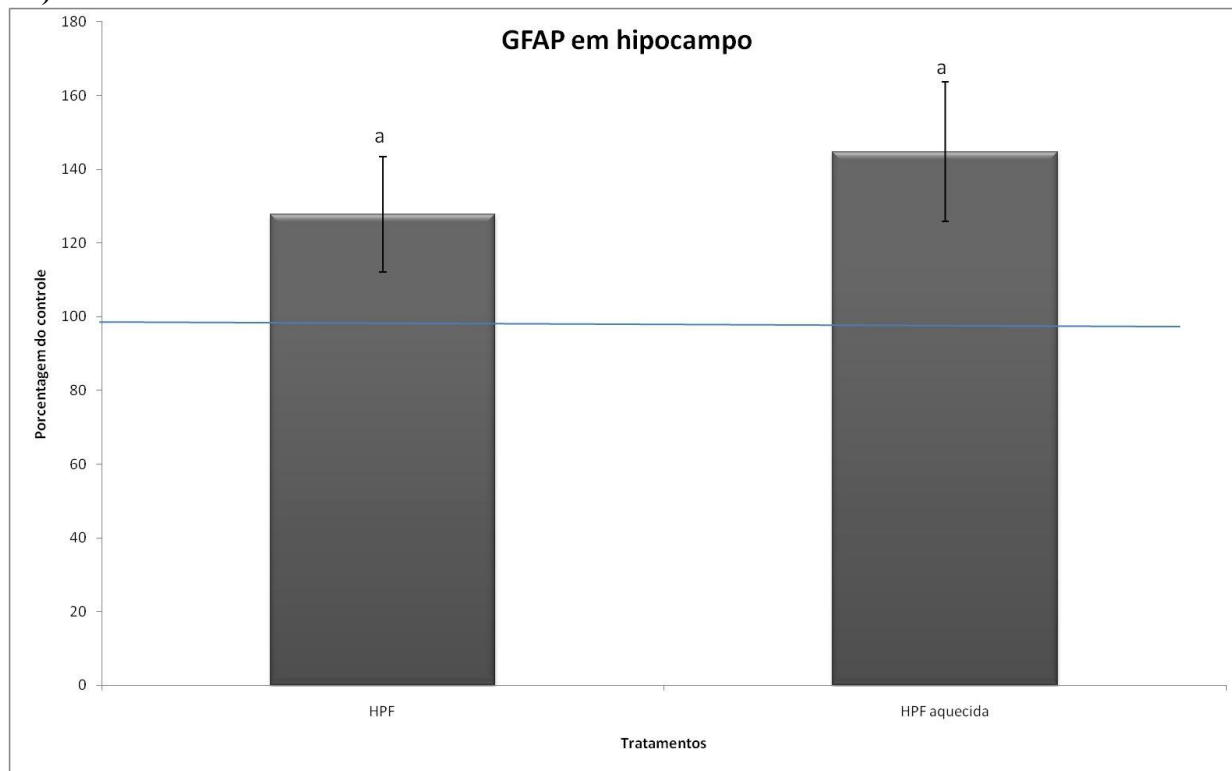


Figura 5. Imunoconteudo de GFAP no hipocampo. Figura representativa da imunodeteccção em a, mostra as bandas da imunodeteccção Os ratos foram tratados durante 4 meses com as dietas HPF e HPFh. Em ambas as dietas a GFAP encontrou-se aumentada (figura 5b), sugerindo a presença de gliose reativa. A letra a acima das barras mostra que a diferença foi significativa em ambas as dietas com relação ao controle.. Analise estatística ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Significancia $p < 0,05$ ($n = 6$).

PARTE III

5. DISCUSSÃO

O aumento da ingesta alimentar e a diminuição do gasto energético associados a vida moderna tem contribuído para o desenvolvimento generalizado da obesidade. No entanto os fatores ambientais não podem explicar completamente o aumento nas taxas de prevalência da obesidade (Levin 2000; Moreno, Quintela et al. 2001). A obesidade está relacionada à resistência a insulina e hiperinsulinemia e um grande risco para o desenvolvimento do DMII e doenças relacionadas.

A dieta hiperpalatável ou dieta de cafeteria, como já falamos anteriormente, tem sido bem descrita como indutora do aumento do peso corporal e massa de tecido adiposo em ratos após curto período de tempo (Roca, Proenza et al. 1999; Rodriguez, Quevedo-Coli et al. 2001). A dieta hiperpalatável é um modelo amplamente utilizado para mimetizar o DMII, e como foi extensamente explanado neste trabalho, o aquecimento desta dieta leva ao aumento da produção de AGEs. Vários tipos de dietas ricas em lipídios e/ou carboidratos têm sido utilizados para estudar os efeitos destas dietas sobre o metabolismo e ganho de peso corporal. Neste trabalho utilizamos uma dieta rica em carboidratos e hiperpalatável submetida ou não ao aquecimento. Primeiramente avaliamos os efeitos da dieta sobre parâmetros metabólicos, como uma maneira de comprovar a eficácia da dieta na indução da obesidade, RI e DMII. Quando verificamos o ganho de peso, vimos que em ambas as dietas o ganho de peso foi significativamente maior, tanto quando avaliamos o peso corporal, quanto quando avaliamos o peso do tecido adiposo. Os ácidos graxos livres e triglicerídeos plasmáticos mostraram-se elevados na dieta aquecida, enquanto no fígado os triglicerídeos não diferiram entre os grupos. Apenas o glicogênio hepático apresentou-se diminuído na dieta aquecida. Estes dados comprovam a dieta como modelo eficaz para nosso estudo.

Analisamos então o efeito da dieta hiperpalatável per se e do seu aquecimento sobre a via da sinalização da insulina. Começamos analisando a proteína PI3K, proteína esta com importantes papéis no SNC, desde a regulação metabólica mediada por insulina e leptina (Gerozissis 2008) até na neurotransmissão e plasticidade (Corominas, Roncero et al. 2007). Na realidade, em nível molecular, a insulina e leptina levam a ativação da PI3K, e esta ativação não se limita ao metabolismo energético do SNC. Portanto, alterações na via da

PI3K, além de distúrbios na homeostase energética podem estar ligadas ao desenvolvimento de outras doenças cerebrais, como as doenças neurodegenerativas (van der Heide, Ramakers et al. 2006).

Os AGEs são constantemente formados em condições fisiológicas, mas seu valor é aumentado dramaticamente durante a hiperglicemia (origem endógena) e consumo de alimentos preparados com aquecimento, ricos em lipídios ou carboidratos (origem exógena) (Sandu, Song et al. 2005). A glicação de proteínas ou a formação dos AGEs afetam a sinalização celular, e conseqüentemente, a comunicação e sobrevivência (Goldin, Beckman et al. 2006). A ativação dos RAGEs desencadeia vários mecanismos de sinalização, incluindo a PI3K. Nós investigamos o conteúdo de PI3K no hipocampo e hipotálamo, após 4 meses de administração das dietas HPH e HPFh. No hipocampo dos ratos que receberam HPF, descobrimos que o conteúdo de PI3K (subunidades p85 e p110) é reduzido, sugerindo que uma inibição desta via ocorre sob esta dieta. Diminuição da PI3K pode ser resultante de uma regulação, devido a hiperativação. Esta diminuição, por sua vez, poderia afetar atividades cerebrais hipocampais dependentes desta via.

No músculo esquelético, a atividade da PI3K estimulada por insulina e diminuída em pacientes diabéticos tipo II obesos ou não (Bjornholm, Kawano et al. 1997; Krook, Bjornholm et al. 2000). Ao contrário, as células renais mesangiais em cultura, tratadas com AGEs exibem um aumento na via da PI3K (Riboulet-Chavey, Pierron et al. 2006). Diferenças metodológicas poderiam explicar essa discrepância, mas em conjunto, estes dados indicam a susceptibilidade da via da PI3K aos AGEs. Curiosamente, quando nossos animais receberam a dieta aquecida, observamos um aumento do conteúdo da subunidade regulatória, p85 da PI3K. Este aumento pode ser uma manifestação de resistência à insulina (Shepherd 2005), mas os níveis de RNAm da subunidade p85 (verificados pela técnica de PCR em tempo real), ao contrario, foram menores nos ratos alimentados com a dieta HPF aquecida ou não. Portanto, o significado deste aumento da expressão do RNAm para p85 não esta claro. No entanto, os níveis da subunidade catalítica são menores, e não podemos descartar a possibilidade de que no final a atividade da PI3K seja menor que o grupo controle.

Outro aspecto intrigante é que o hipotálamo dos ratos não foi afetado pela dieta HPF. Está claro que a PI3K tem diferentes envolvimentos funcionais nestas regiões (Wada,

Yokoo et al. 2005). No entanto, a diferença observada neste trabalho também pode refletir a diferente suscetibilidade dos tecidos ao estresse pelos glicoxidantes ou pelos AGEs resultantes. Vascularização diferenciada e heterogeneidade dos tipos celulares e conexões são responsáveis pela suscetibilidade de diferentes regiões do cérebro. Por exemplo, o diabetes mellitus induzido por estreptozotocina afeta o hipotálamo e hipocampo de maneiras diferentes (Beauquis, Homo-Delarche et al. 2008). Portanto, seria concebível que a via PI3K mediada por RAGEs em hipocampo seja mais suscetível a glicotoxicidade que no hipotálamo, mas não sabemos se nossos achados são exclusivamente mediados por esse receptor. Quando analisamos a quantidade relativa de RNA mensageiro encontramos a subunidade p85 aumentada na dieta HPFh e a subunidade p110 aumentada na dieta HPF, como não encontramos alterações na quantidade das proteínas, acreditamos que o hipotálamo realmente não foi tao afetado pelas dietas como o hipocampo.

O passo seguinte foi investigar um alvo subsequente da ativação da PI3K, no hipocampo e no hipotálamo. No hipocampo nenhuma alteração foi observada na quantidade total da proteína Akt nem nos níveis de fosforilação em ser 473. Além disso, nenhuma mudança foi observada na quantidade de Akt no hipotálamo de ratos que foram alimentados com a dieta HPF aquecida ou não. Ao contrario da situação do hipocampo, no entanto, a fosforilação da ser 473 foi diminuída. A fosforilação neste sitio esta associada a ativação da Akt (Shepherd 2005). Estes dados sugerem que a dieta HPF aquecida ou não, causou uma diminuição na atividade da Akt no hipotálamo, apesar de os níveis das proteínas PI3K e Akt não terem sido alterados. Quanto as quantidades de RNAm, não encontramos diferença na expressão do RNAm para Akt em hipocampo, mas o RNAm encontrou-se aumentado na dieta HPF em hipotálamo. Este aumento não refletiu em aumento da expressão da proteína no hipotálamo, o que pode envolver os mecanismos de turnover e síntese protéica. Em músculo esquelético de pacientes com DMII, apesar de encontramos a atividade da PI3K prejudicada, a atividade da Akt encontra-se normal nesses indivíduos (Kim, Nikoulina et al. 1999). De acordo com Riboulet-Chavey e colaboradores (Riboulet-Chavey, Pierron et al. 2006), metilglioxal inibiu a fosforilação da Akt estimulada por insulina, sem afetar o nível do receptor para insulina em tirosina. A Akt medeia os efeitos da PI3K em alguns eventos celulares, tais como apoptose (Franke, Kaplan et al. 1997). Também esta envolvida na fosforilação e inativação da glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3), regulador negativo da

síntese de glicogênio através de seu efeito inibitório sobre a atividade da glicogênio sintase. Portanto mudanças na atividade da Akt envolvem inúmeras alterações tanto em vias de metabolismo, quanto sobrevivência e morte celular.

Para finalizarmos as investigações envolvendo a sinalização da insulina, analisamos o substrato do receptor da insulina (IRS-1), passo que antecede a ativação da PI3K. A quantidade total de IRS-1 não foi diferente do controle após 4 meses de tratamento com a dieta HPF, aquecida ou não, em hipocampo e hipotálamo. Além disso, não foram encontradas diferenças na quantidade de sítios fosforilados em tirosina 307 e tirosina 612, envolvidos na desativação e ativação do IRS-1, respectivamente (Bloch-Damti, Potashnik et al. 2006). Estes dados indicam que a proteína IRS-1 (quantidade e atividade) é aparentemente mais preservada dos insultos sofridos pelos AGEs, após 4 meses de dieta, que as outras proteínas (PI3K e Akt) na sinalização da insulina. No entanto, a quantidade de RNAm no hipocampo estava aumentada nos animais que receberam ambas as dietas, e no hipotálamo o RNAm estava aumentado apenas nos animais que receberam a dieta HPFh. Novamente, podemos inferir que os tratamentos podem estar interferindo no turnover ou na síntese protéica. No músculo esquelético o IRS-1 interage diretamente com os RAGEs, o que poderia estar envolvido na resistência à insulina durante a hiperglicemia crônica e exposição aos AGEs (Cassese, Esposito et al. 2008). Estudos mostram que a maioria das respostas a insulina, principalmente aquelas associadas ao crescimento e metabolismo dos carboidratos envolve IRS-1 e IRS-2 (White and Strayer 2002).

Recentemente descobriu-se que a ativação do IRS-1/PI3K e Akt esta prejudicada no fígado de ratos Goto-kakizaki (GK) diabéticos ao contrario dos camundongos ob/ob diabéticos, que mantem a ativacao do IRS-1/PI3K e Akt totalmente ou bem preservadas (Farese, Sajan et al. 2005).

Em resumo, podemos dizer que a via da PI3K em hipocampo e Akt em hipotálamo, são afetadas em ratos que foram submetidos a uma dieta HPF crônica. Além disso, a dieta aquecida causou alterações diferenciadas na subunidade reguladora da PI3K, sugerindo que os AGEs exógenos causaram dano na via. Estes dados reforçam a idéia que os AGEs exógenos podem afetar a sinalização da Akt mediada pela PI3K. No cérebro estas vias estão relacionadas ao metabolismo energético, neurotransmissão e plasticidade sináptica.

Portanto estes resultados contribuem para a compreensão dos distúrbios cognitivos associados ao comprometimento do hipocampo, que são induzidos pelas condições que favorecem a glicação de proteínas, tais como as condições do DMII e hiperglicemia crônica.

Como já foi citado inúmeras vezes neste trabalho, o aquecimento da dieta HPF leva ao aumento da produção de AGEs, e estes podem causar mudanças patológicas nos tecidos de duas maneiras diferentes: formando ligações cruzadas covalentes que alteram a estrutura e função de proteínas ou interagindo com receptores de superfície celular, dando início a eventos intracelulares que induzem o estresse oxidativo e inflamação (Eble, Thorpe et al. 1983; Vlassara 2001). Os AGEs têm receptores específicos, mas também podem ativar sinais independente de seus receptores, através da formação de radicais livres. Os produtos de glicoxidação podem acelerar a geração de radicais livres, estresse oxidativo e carbonilação (Miyata, Ishikawa et al. 2003).

O estresse oxidativo e o dano tecidual são marcas presentes em doenças crônicas e morte celular (Baynes and Thorpe 1999). Há cada vez mais provas de que, em certos estados patológicos, o aumento na produção e/ou ineficácia nas defesas antioxidantes podem desempenhar papel crucial na determinação de lesão tecidual. Os níveis de redução intermediária dos produtos do metabolismo do oxigênio são controlados por vários mecanismos de defesa celular que consistem enzimáticas [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (Gpx)/redutase da glutatona oxidada (GSSG-RD) e não enzimática (compostos como a glutatona)]. Muitos estudos tem focado o estado antioxidante e estresse oxidativo no DMII.

Além disso, é demonstrado que dietas com alto teor de lipídeos ou altamente calóricas aumentam a geração de radicais livres no cérebro de roedores (Zhang, Dong et al. 2005). Os níveis elevados de glicose sanguínea têm sido considerados uma importante fonte de produção de radicais livres em indivíduos intolerantes a glicose (Brownlee 2005), uma vez que altos níveis de glicose bloqueiam o fluxo de elétrons da cadeia de transporte, gerando níveis elevados de superóxido (Nishikawa, Edelstein et al. 2000; Brownlee 2005). O cérebro e especialmente vulnerável aos danos oxidativos como resultado do alto consumo de oxigênio, do abundante conteúdo de lipídios e relativa escassez de enzimas quando comparado a outros tecidos.

Em nosso estudo encontramos indicadores de estresse oxidativo representados pelo aumento da atividade da SOD e das quantidades de grupos tiólicos não protéicos (estudos mostram que cerca de 87% destes grupos provém da glutatona). O aumento na atividade da SOD indica a presença de grandes quantidades de superóxido e a tentativa da enzima removê-lo. Com relação a glutatona, os estudos são controversos. A maioria deles mostra redução na quantidade de glutatona tanto em modelos de DMI quanto DMII (Murakami, Kondo et al. 1989; Melo, Arantes et al. 2000; Rauscher, Sanders et al. 2001), enquanto outros modelos levam ao aumento da glutatona (Mekinova, Chorvathova et al. 1995; Borenshtein, Ofri et al. 2001). Podemos inferir que um modelo crônico, como o nosso modelo de 4 meses de dieta, poderia levar ao aumento por mecanismo de adaptação.

Das espécies reativas de oxigênio, o altamente reativo radical hidroxila reage com o ADN pela adição de ligações duplas e pela abstração de um H do grupo metil da timina e cada uma das ligações C-H da 2-deoxirribose. O ensaio cometa, em condições alcalinas, detecta quebras simples e duplas na fita de ADN (Tice, Agurell et al. 2000). A ruptura do ADN pode ser causada por nucleases ativadas por Ca^{2+} e/ou ROS, principalmente OH^{\cdot} , formado pela reação de H_2O_2 com íons metal ligados ao ADN (Darley-Usmar and Halliwell 1996). Quando a produção de EROS ultrapassa a capacidade do sistema oxidante celular, o estresse oxidativo ocorre, o que leva a danos oxidativos a biomoléculas, incluindo ADN (Winyard, Moody et al. 2005; Lovell and Markesbery 2007). Livre acesso a dieta HPFh durante 4 meses aumentou as rupturas do ADN no hipocampo. Esta mesma dieta aquecida ou não, induziu aumento do dano ao ADN em hipotálamo, estriado e córtex cerebral (dados não mostrados), demonstrando que os danos causados atingem todo o SNC.

Diabetes mellitus tipo I e II resulta em deficiência da insulina e/ou resistência a insulina, hiperglicemia e altera o metabolismo lipídico, dos carboidratos e das proteínas. Ambos os tipos de diabetes afetam o SNC e estão associados ao aumento de epilepsia, acidente vascular cerebral, demência e déficit cognitivo (Whiting, Camfield et al. 1997; Ott, Stolk et al. 1999; Biessels, Koffeman et al. 2006; Biessels, Deary et al. 2008; Tiehuis, Vincken et al. 2008). Estas patologias surgem a partir de mudanças no metabolismo cerebral, reatividade vascular e aumento do estresse oxidativo (Mankovsky, Metzger et al. 1996; Horani and Mooradian 2003; Manschot, Biessels et al. 2007; Valko, Leibfritz et al. 2007). Os astrócitos exercem papel importante no metabolismo energético cerebral, na manutenção da

barreira hemato-encefálica, na regulação dos níveis de glutamato extracelular, e proteção contra ROS, entre outras funções (Tsacopoulos and Magistretti 1996; Dringen, Gutterer et al. 2000; Zonta, Angulo et al. 2003). Estas observações nos levam a supor que a atividade astrocitária alterada contribui para a fisiopatologia do SNC associadas ao diabetes. Outras alterações cerebrais presentes em ambos os tipos de DM incluem a expressão anormal de peptídeos hipotalâmicos (Dheen, Tay et al. 1994; Saravia, Gonzalez et al. 2001), astrogliose hipocampal (Saravia, Revsin et al. 2002), diminuição da plasticidade sináptica hipocampal (Kamal, Biessels et al. 1999; Magarinos and McEwen 2000), neurotoxicidade e alterações na captação de glutamato (Chabot, Massicotte et al. 1997; Valastro, Cossette et al. 2002).

Anormalidades astrocitárias no hipocampo têm sido observadas durante o estresse, envelhecimento, doenças auto-imunes e degenerativas e modelo de diabetes induzida por STZ em ratos (da Silva, Machado et al. 1984; Revsin, Saravia et al. 2005). Nestes animais, danos hipocampais, causando hiperreatividade ao estresse e que envolvem tanto neurônios quanto astrócitos tem sido observados (Bestetti and Rossi 1980; Magarinos and McEwen 2000). Portanto, os astrócitos parecem ser um dos principais alvos em potencial durante a homeostase da glicose, incluindo hiper e hipoglicemia. A astrocitose é frequentemente relacionada a doenças neurodegenerativas e do envelhecimento, nas quais disfunção neuronal ou danos podem ser encontrados ((Goss, Finch et al. 1991; Eng and Ghirnikar 1994; Magistretti and Pellerin 1999).

Saravia e colaboradores encontraram previamente, em dois modelos de DMI, aumento na quantidade de GFAP em astrócitos no hipocampo stratum radiatum (Saravia, Revsin et al. 2002). Estes modelos animais incluem camundongos diabéticos não obesos (NOD), os quais desenvolvem espontaneamente a doença, e, portanto, facilita análises pré e pós o desenvolvimento do diabetes. Outro modelo muito estudado é o modelo de diabetes induzido por STZ, no qual se estudam as alterações após o desenvolvimento da doença. Utilizando camundongos não obesos e camundongos C57BL/6 (tratados com STZ), foi encontrado aumento nas células GFAP+ e depois de 8 semanas aumento na imunorreatividade para GFAP. Porém, alguns trabalhos mostram que há uma diminuição na expressão de GFAP em ratos com DMI (Coleman, Judd et al. 2004; Dennis, Coleman et al. 2005; Afsari, Renno et al. 2008).

Em nosso estudo, observamos aumento no imunoconteúdo de GFAP após 4 meses de tratamento com as dietas HPF e HPFh. Podemos inferir que as diferenças encontradas nas quantidades de GFAP podem ser devido às diferenças dos modelos utilizados, também podemos sugerir que o aumento no imunoconteúdo da GFAP encontrado neste trabalho pode ser um processo adaptativo, devido ao período longo do tratamento. Estes processos adaptativos são mecanismos de plasticidade bem estabelecidos em hipocampo.

Alterações nas funções dos astrócitos também podem contribuir para os danos oxidativos associados ao diabetes (Bhardwaj, Sharma et al. 1998; Rosen, Nawroth et al. 2001; Mastrocola, Restivo et al. 2005). Os astrócitos são componente integral do sistema de defesa antioxidante do cérebro, através da regulação das concentrações de glutamato extracelular e da produção de compostos antioxidantes (Dringen, Gutterer et al. 2000; Hertz and Zielke 2004; Trendelenburg and Dirnagl 2005) Um aumento significativo no estresse oxidativo, que causa danos aos tecidos, faz parte dos sintomas do diabetes (Rosen, Nawroth et al. 2001; Mastrocola, Restivo et al. 2005). Elevados níveis de glutamato foram notificados em indivíduos diabéticos, e o aumento na concentração de glutamato pode contribuir para a produção de ROS (Ambati, Chalam et al. 1997; Hansson, Muyderman et al. 2000).

A regulação extracelular do glutamato pelos astrócitos ocorre por mecanismos de captação sódio-dependente e sódio-independente (Danbolt 2001). Cinco transportadores de alta afinidade, sódio-dependente já foram clonados: GLAST/EAAT1, GLT1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 E EAAT5 (Rothstein, Martin et al. 1994; Gegelashvili and Schousboe 1998). Os transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT1 são localizados principalmente nos astrócitos e têm papel crítico na manutenção dos níveis de glutamato extracelular, em níveis seguros (Danbolt 2001). A captação de glutamato sódio-independente pelo transportador-xc nos astrócitos está diretamente ligado a um trocador glutamato-cistina, e produção de glutathione (Dringen, Gutterer et al. 2000; La Bella, Valentino et al. 2007).

Depois de 4 meses de tratamento com as dietas HPF e HPFh, nós encontramos aumento na captação de glutamato em hipocampo nos animais tratados com a dieta HPFh, mas não encontramos diferença significativa na atividade da enzima glutamina sintetase (enzima responsável pela metabolização de glutamato em glutamina nos astrócitos).

Coleman e colaboradores (Coleman, Dennis et al. 2010), utilizaram modelo de DMI

(administração de estreptozotocina – composto que destrói seletivamente as células beta-pancreáticas (McNeill, Delgatty et al. 1991), mimetizando DMI). Em hipocampo o conteúdo de GFAP estava diminuído nos animais submetidos ao modelo de DMI. Quando analisaram a captação de glutamato em vesículas gliais, encontraram um aumento desta captação nos animais com DMI. A diminuição no conteúdo de GFAP observada nos animais diabéticos pode ser reflexo de uma diminuição no número de astrócitos. Astrócitos não são idênticos e astrócitos de diferentes regiões respondem diferentemente ao DM.

Neste mesmo trabalho, Coleman e seus colaboradores (Coleman, Dennis et al. 2010), encontraram a captação de glutamato aumentada (em torno de 20-25% maior em relação ao controle), mas não encontraram quantidades aumentadas dos transportadores GLAST e GLT-1. Estes resultados sugerem, portanto, que o aumento na captação de glutamato foi resultado de um aumento da afinidade dos transportadores pelo glutamato (Duan, Anderson et al. 1999; Ward, Jobling et al. 2005). Ward e colaboradores (Ward, Jobling et al. 2005) não encontraram alterações na expressão de GLAST e EAAT4 após 12 semanas da indução do DM em células gliais de retina, embora a captação de glutamato aumentou logo em uma semana. O aumento da captação de glutamato foi atribuído ao aumento da eficiência da captação. O aumento da captação de glutamato em ratos diabéticos poderia ser uma mudança funcional compensatória para proteger os neurônios dos efeitos excitotóxicos do glutamato.

Já é bem estabelecido que o DM provoca alterações nos sistemas de transporte de aminoácidos e/ou alterações em algumas populações celulares. Vilchis e Salceda, já em 1996, relataram aumento na captação de taurina e GABA, enquanto glicina e glutamato não foram afetados, em retina de ratos diabéticos.

Em resumo, nossos resultados primeiramente confirmam o modelo como um modelo eficaz de obesidade e DMII. Com relação a via de sinalização da insulina, nossos dados indicam que a via PI3K no hipocampo e Akt no hipotálamo são afetadas em ratos que sofreram exposição crônica a uma dieta HPF. Além disso, a dieta quando aquecida causou alterações diferentes na subunidade reguladora da PI3K, sugerindo que os danos dos AGEs exógenos estariam agindo na sinalização celular. Estes dados reforçam a ideia de que os AGEs gerados pelo aquecimento da dieta, ou seja, os AGEs exógenos, podem afetar a via da

PI3K/Akt. No cérebro esta via esta relacionada ao metabolismo energético, neurotransmissão e plasticidade. Portanto, estes resultados contribuem para nossa compreensão dos distúrbios cognitivos associados ao comprometimento do hipocampo que são induzidos por glicação de proteínas, tais como acontecem no DM e hiperglicemia crônica.

Nossos dados também mostraram dano oxidativo em hipocampo, onde encontramos atividade aumentada da SOD, o que indica grande quantidade de EROs. Também encontramos dano aumentado ao DNA não somente em hipocampo como no estriado, hipotálamo e córtex (dados não mostrados neste trabalho). Isto indica que o cérebro como um todo é suscetível aos danos causados pelo estresse oxidativo.

Posteriormente analisamos o metabolismo glutamatérgico, já que os astrócitos exercem importante papel no SNC, na detoxificação do glutamato através de sua captação e metabolização, da sua atividade antioxidante que envolve a produção de glutatona, entre outras funções muito relevantes no SNC. Encontramos a captação aumentada no hipocampo dos animais que receberam a dieta HPFh, mas não encontramos nenhuma alteração na atividade da GS em nenhum dos tratamentos. Quanto a quantificação da GFAP (proteína marcadora de astrócitos), encontramos seu imunocnteuado aumentado em ambas as dietas. Estes dados mostram o envolvimento dos astrócitos na fisiopatologia do DM, onde o aumento na quantidade de GFAP indica uma gliose reativa, mecanismo relacionado a varias desordens do SNC. As alterações no metabolismo do glutamato são outro indicador do envolvimento dos astrócitos no mecanismo do DM no SNC.

Sabemos que DMII esta relacionada a déficits cognitivos. Nossos dados preliminares mostram que os animais submetidos a dieta HPFh são mais ansiosos. Isto foi visto pelo teste do labirinto em cruz elevado, onde os animais submetidos a dieta HPFh permaneceram mais tempo nos braços fechados. Alem disso, os animais que receberam a dieta HPFh se locomoveram menos no teste do campo aberto. Para realmente podermos analisar déficits cognitivos envolvendo o hipocampo, teremos que realizar outros testes como o water maze, esquiua inibitória, dentre outros.

Estudos populacionais com pacientes sobrepeso e obesos mostraram que existe uma prevalência maior de doenças psiquiátricas dentre estes, especialmente ansiedade, depressão e transtornos de humor (Becker, Margraf et al. 2001; Chakravarthy and Booth

2004; Simon, Von Korff et al. 2006; Teegarden and Bale 2007). A ansiedade é uma das desordens psiquiátricas mais prevalentes atualmente (Gingrich 2005) e recentemente foi associada ao estresse oxidativo, por meio de estudos que mostraram que genes envolvidos na produção de radicais livres e nas defesas antioxidantes poderiam modular para mais ou para menos o nível de ansiedade em modelos animais, dependendo de maior ou menor nível de estresse gerado (Hovatta, Tennant et al. 2005; Berry, Skarie et al. 2008). A hiperglicemia presente na obesidade, na RI e no DMII é responsável por altos níveis de estresse oxidativo nestas situações, uma vez que causa bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, gerando elevados níveis de ERO.

Portanto, para chegarmos a conclusões mais precisas sobre os efeitos do DMII induzido pela dieta sobre o SNC precisaremos realizar mais estudos metabólicos, das vias envolvidas, moleculares e comportamentais.

ANEXO I

Resultados preliminares de comportamento

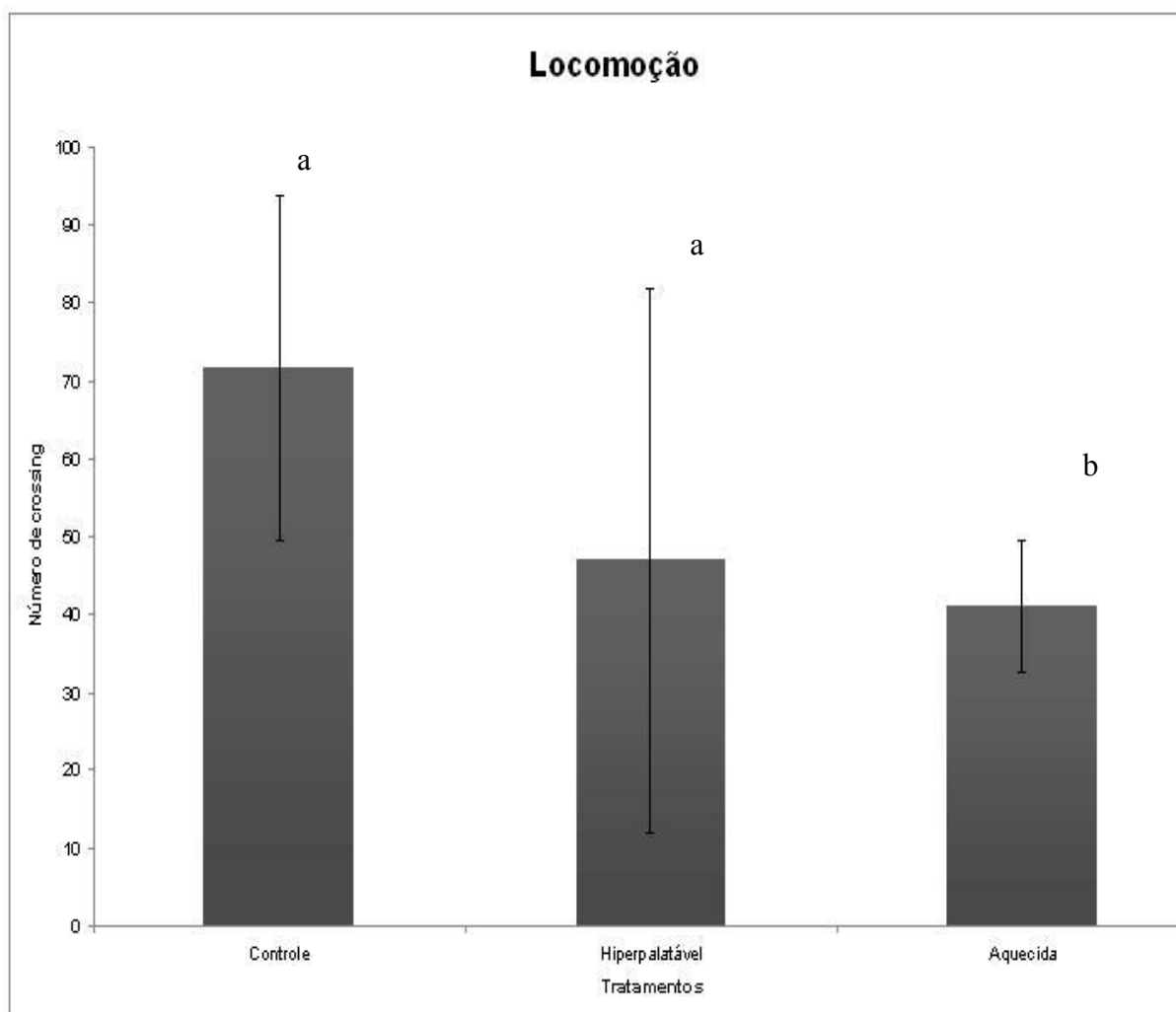


Figura 1. Avaliação da atividade locomotora dos animais submetidos ao teste Campo Aberto, após tratamento com as dietas HPF e HPFh. Número de crossing que os animais realizaram no teste do Campo Aberto em 5 minutos de observação. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do Teste de Duncan. Significância $p < 0,05$.

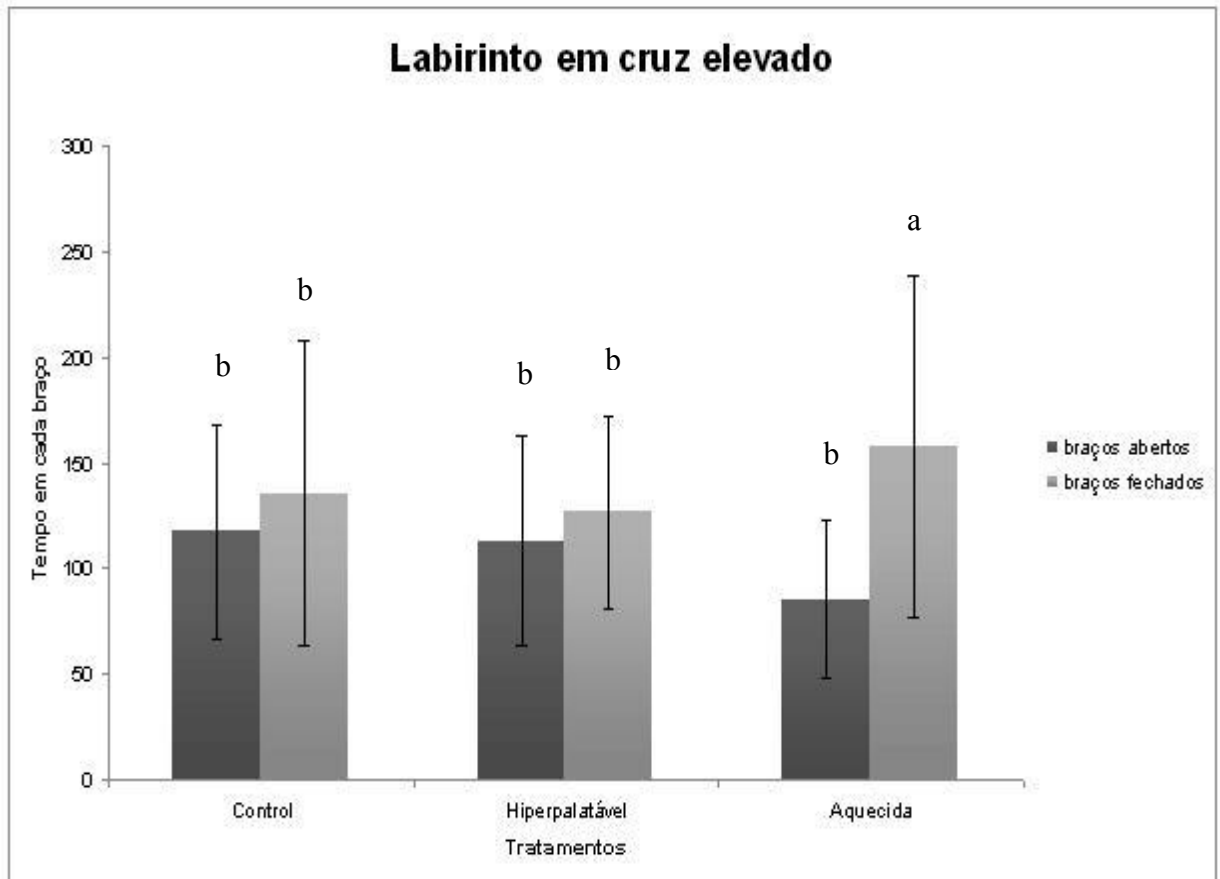


Figura 2. Avaliação de ansiedade pelo Teste do Labirinto em Cruz Elevado, realizado após tratamento dos animais com as dietas HPF e HPFh. Os animais ansiosos tendem a ficar mais tempo nos braços fechados do labirinto. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do Teste de Duncan. Significância $p < 0,05$.

Quando analisamos o teste Campo Aberto, percebemos que os animais tratados com a dieta HPFh se locomoveram menos que os demais animais, enquanto que no Labirinto em Cruz Elevado os animais tratados com a dieta HPFh permaneceram mais tempo nos braços fechados quando comparamos aos demais grupos. Estes resultados indicam que a dieta HPFh aumentou a ansiedade dos animais.

ANEXO II

Quantificação relativa dos RNAs mensageiros das proteínas da via de sinalização da insulina:

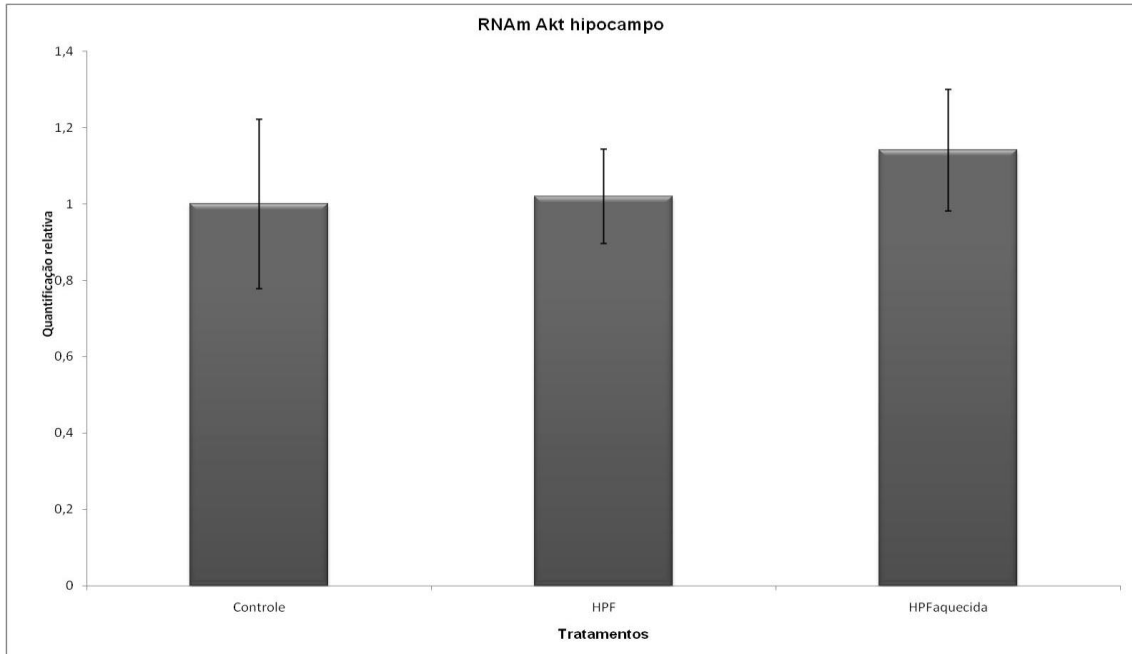


Figura 1. Quantificação relativa por PCR em tempo real do RNAm para Akt no hipocampo. Os ratos foram tratados durante 4 meses com dieta HPF e HPFh. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Significância: $p > 0,05$.

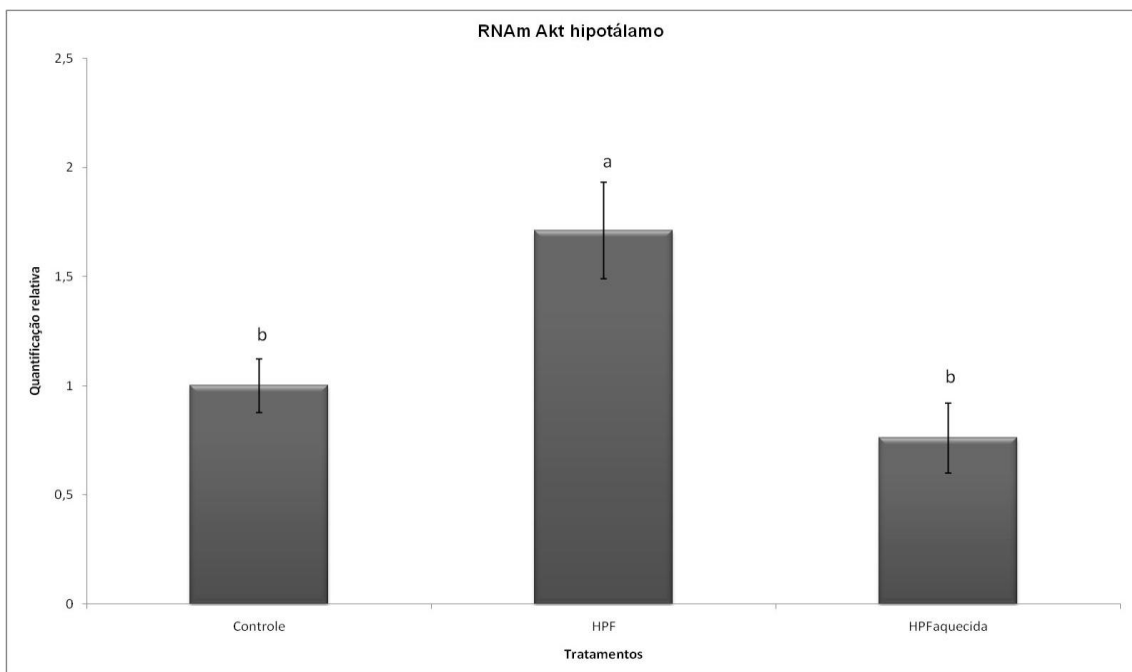


Figura 2. Quantificação relativa por PCR em tempo real para Akt no hipotálamo. Os ratos foram tratados durante 4 meses com dieta HPF e HPFh. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Significância: $p > 0,05$.

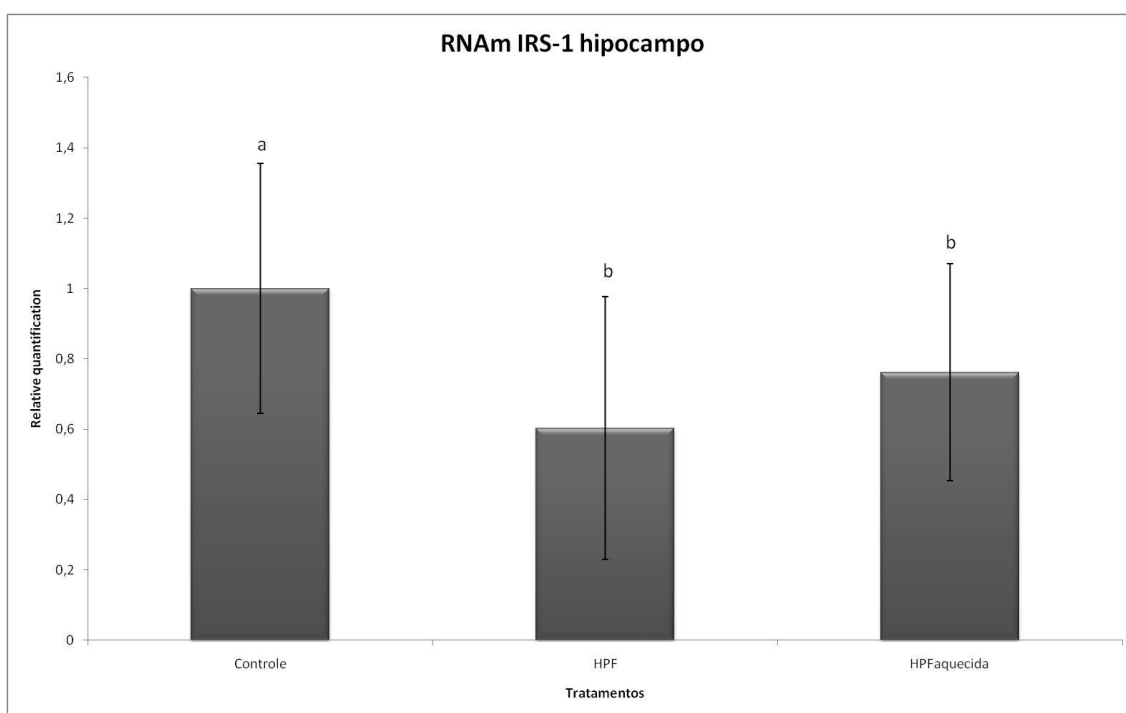


Figura 3. Quantificação relativa por PCR em tempo real para IRS-1 no hipocampo. Os ratos foram tratados com dieta HPF e HPFh durante 4 meses. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Significância: $p > 0,05$.

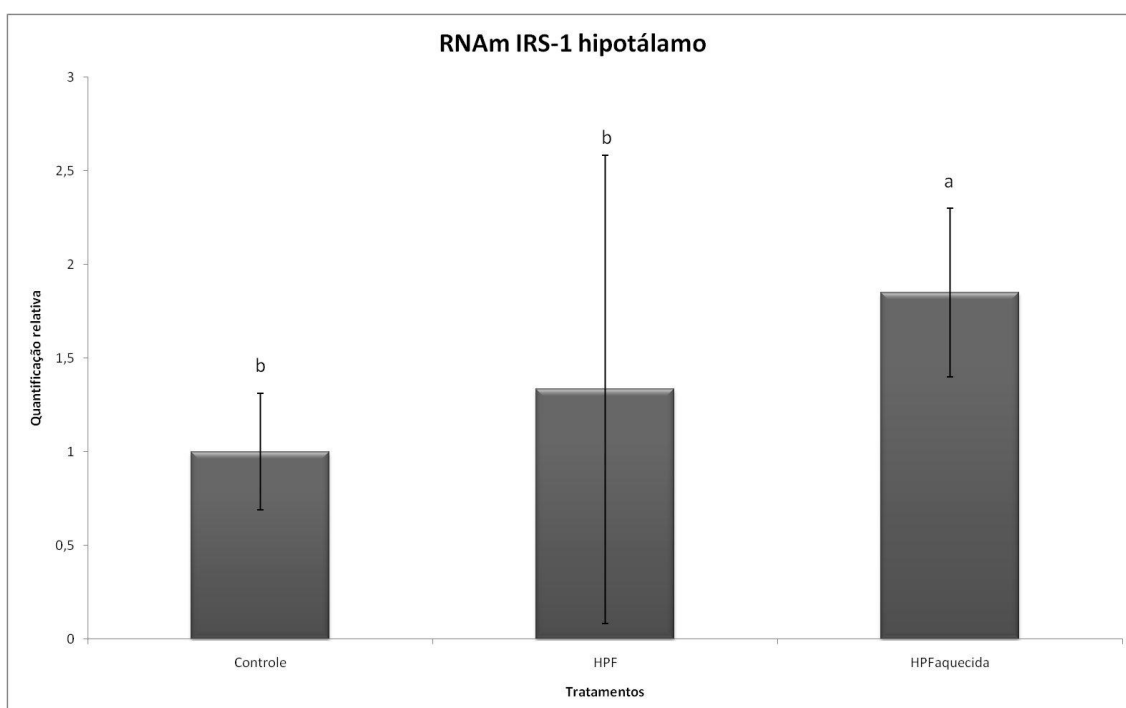


Figura 4. Quantificação relativa por PCR em tempo real para IRS-1 no hipotálamo. Os ratos foram tratados com dieta HPF e HPFh durante 4 meses. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Significância: $p > 0,05$.

Quando analisamos a quantificação relativa dos RNA mensageiros das proteínas da via de sinalização da insulina, vimos que o tratamento de 4 meses com as dietas hiperpalatáveis alterou as quantidades de RNA. Provavelmente devido a grandes quantidade de AGE e estresse oxidativo aumentado, o que pode ter alterado a síntese protéica ou o turnover das proteínas.

ANEXO III

Captação de deoxi-glicose em hipocampo de ratos submetidos a 4 meses de dieta HPF e HPFh, induzida ou não por insulina.

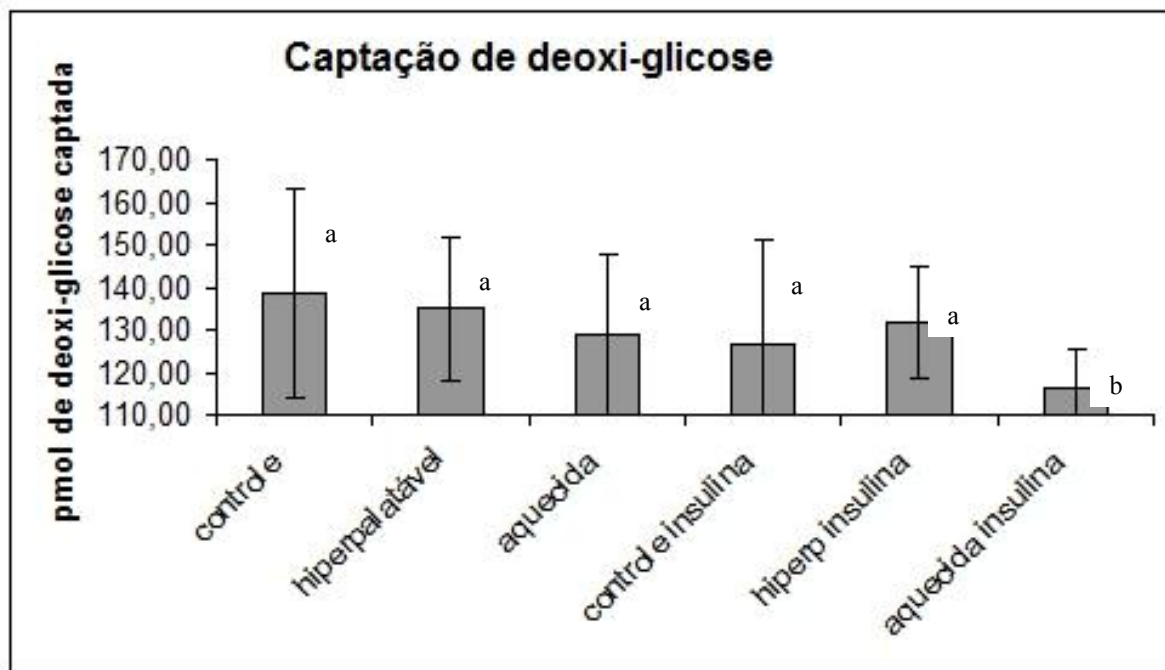


Figura 1. Captação de deoxi-glicose induzida ou não por insulina no hipocampo. Os ratos foram submetidos a 4 meses de dieta HPF e HPFh. As letras a representam os grupos iguais ao controle, enquanto a letra b mostra o grupo diferente significativamente do controle. Análise estatística ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan. Significância $p < 0,05$.

A captação de deox-glicose é estimulada pela insulina em condições fisiológicas normais. No entanto quando verificamos a captação da deoxi-glicose em hipocampo de ratos, após 4 meses de tratamento com as dietas HPF e HPFh, verificamos que mesmo induzindo a captação com insulina, a captação nos hipocampos dos animais tratados com a dieta HPFh estava diminuída com relação aos demais grupos.

ANEXO IV

Dano ao DNA em diferentes estruturas do SNC.

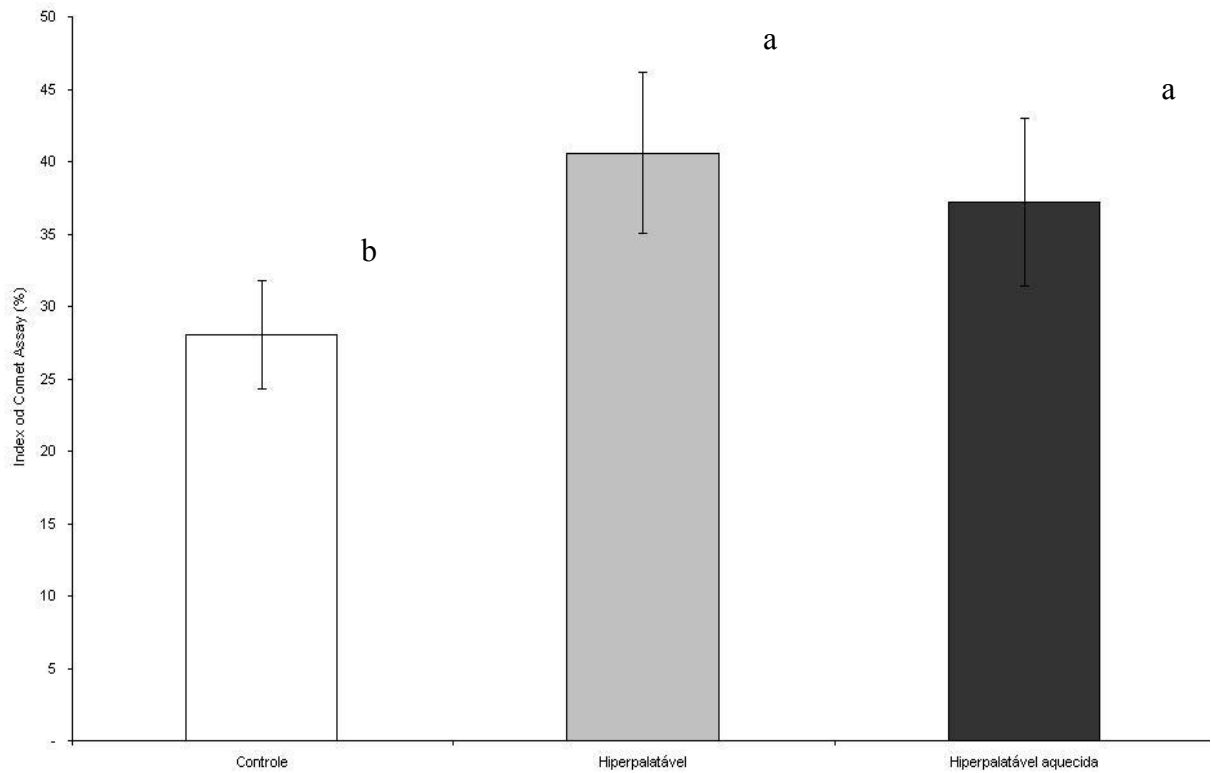


Figura 1. Dano oxidativo ao DNA no hipotálamo. Os animais foram tratados por 4 meses com as dietas HPF e HPFh. O dano foi medido pelas quebras simples e duplas da fita da DNA pelo Ensaio Cometa. As letras a nas colunas mostram os grupos significativamente diferentes do controle (b). Análise estatística ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan. Significância $p < 0,05$.

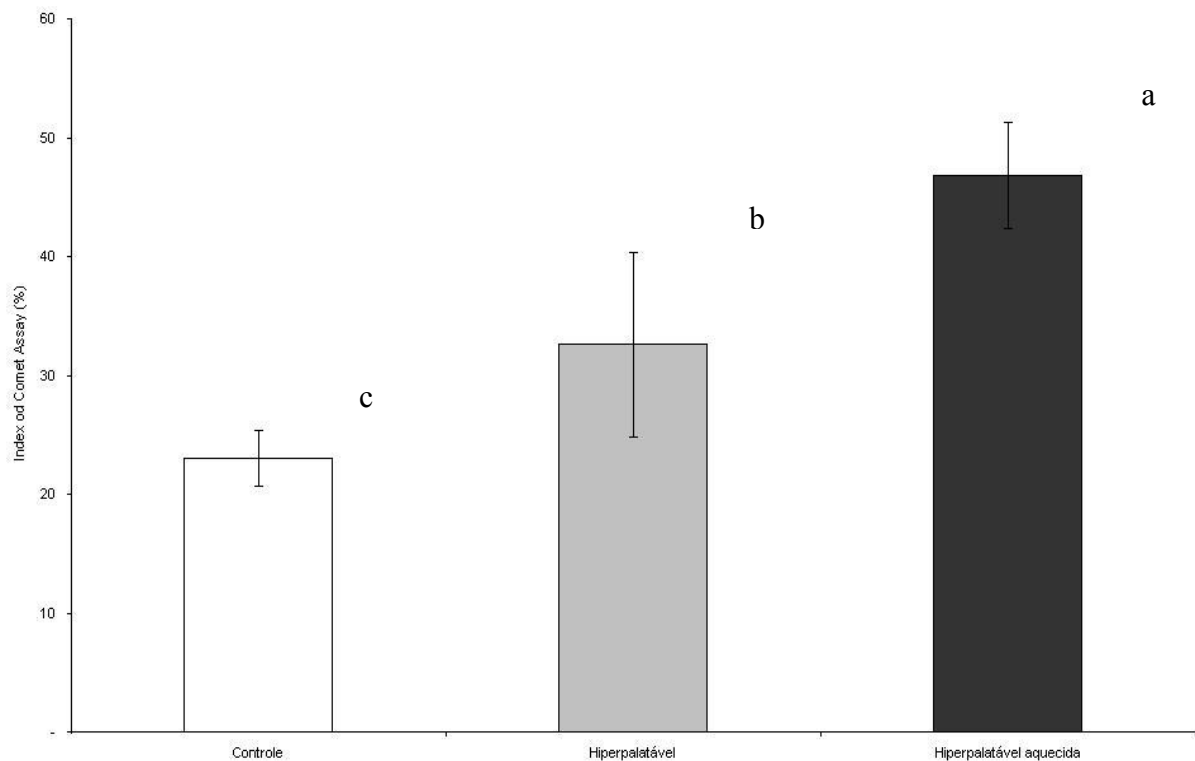


Figura 2. Dano oxidativo ao DNA no estriado. Os ratos foram tratados por 4 meses com as dietas HPF e HPFh. O dano foi medido pelas quebras simples e duplas da fita da DNA pelo Ensaio Cometa. A letra a mostra o grupo HPFh que foi significativamente maior que os demais grupos, b mostra que os animais tratados com a dieta HPF foi significativamente maior que o controle e menor que a dieta HPFh, e a letra c representa o grupo controle. Análise estatística ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan. Significância $p < 0,05$.

Após os 4 meses de tratamento analisamos a presença de dano oxidativo ao DNA através do Ensaio Cometa, no SNC dos ratos. Pudemos ver que as dietas HPF e HPFh induziram dano em hipotálamo e estriado dos ratos. As dietas levaram ao aumento do estresse oxidativo e da quantidade de AGE nos animais, o que pode ser responsável pelo aumento do dano ao DNA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abordo, E. A., H. S. Minhas, et al. (1999). "Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity." Biochem Pharmacol 58(4): 641-648.

Afsari, Z. H., W. M. Renno, et al. (2008). "Alteration of glial fibrillary acidic proteins immunoreactivity in astrocytes of the spinal cord diabetic rats." Anat Rec (Hoboken) 291(4): 390-399.

Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." Diabet Med 15(7): 539-553.

Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet (2008). "Should we dump the metabolic syndrome? No." BMJ 336(7645): 641.

Ambati, J., K. V. Chalam, et al. (1997). "Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy." Arch Ophthalmol 115(9): 1161-1166.

Arushanyan, E. B. and E. V. Beier (2008). "The hippocampus and cognitive impairments." Neurosci Behav Physiol 38(8): 751-758.

Awad, N., M. Gagnon, et al. (2004). "The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function." J Clin Exp Neuropsychol 26(8): 1044-1080.

Aydin, A., H. Orhan, et al. (2001). "Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control." Clin Biochem 34(1): 65-70.

Basta, G., S. Berti, et al. (2008). "Plasma N-epsilon-(carboxymethyl)lysine levels are associated with the extent of vessel injury after coronary arterial stenting." Coron Artery Dis 19(5): 299-305.

Baynes, J. W. and S. R. Thorpe (1999). "Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm." Diabetes 48(1): 1-9.

Beauquis, J., F. Homo-Delarche, et al. (2008). "Brain alterations in autoimmune and pharmacological models of diabetes mellitus: focus on hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis disturbances." Neuroimmunomodulation 15(1): 61-67.

Becker, E. S., J. Margraf, et al. (2001). "Obesity and mental illness in a representative sample of young women." Int J Obes Relat Metab Disord 25 Suppl 1: S5-9.

Berlett, B. S. and E. R. Stadtman (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." J Biol Chem 272(33): 20313-20316.

Berry, F. B., J. M. Skarie, et al. (2008). "FOXO1 is required for cell viability and resistance to oxidative stress in the eye through the transcriptional regulation of FOXO1A." Hum Mol

Genet 17(4): 490-505.

Bestetti, G. and G. L. Rossi (1980). "Hypothalamic lesions in rats with long-term streptozotocin-induced diabetes mellitus. A semiquantitative light- and electron-microscopic study." Acta Neuropathol 52(2): 119-127.

Bhardwaj, S. K., M. L. Sharma, et al. (1998). "Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver, and kidney." Mol Chem Neuropathol 34(2-3): 157-168.

Bhardwaj, S. K., P. Sharma, et al. (1998). "Alterations in free radical scavenger system profile of type I diabetic rat brain." Mol Chem Neuropathol 35(1-3): 187-202.

Biessels, G. J., I. J. Deary, et al. (2008). "Cognition and diabetes: a lifespan perspective." Lancet Neurol 7(2): 184-190.

Biessels, G. J., A. C. Kappelle, et al. (1994). "Cerebral function in diabetes mellitus." Diabetologia 37(7): 643-650.

Biessels, G. J., A. Koffeman, et al. (2006). "Diabetes and cognitive impairment. Clinical diagnosis and brain imaging in patients attending a memory clinic." J Neurol 253(4): 477-482.

Biessels, G. J., L. P. van der Heide, et al. (2002). "Ageing and diabetes: implications for brain function." Eur J Pharmacol 441(1-2): 1-14.

Bjornholm, M., Y. Kawano, et al. (1997). "Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation." Diabetes 46(3): 524-527.

Bloch-Damti, A., R. Potashnik, et al. (2006). "Differential effects of IRS1 phosphorylated on Ser307 or Ser632 in the induction of insulin resistance by oxidative stress." Diabetologia 49(10): 2463-2473.

Borenshtein, D., R. Ofri, et al. (2001). "Cataract development in diabetic sand rats treated with alpha-lipoic acid and its gamma-linolenic acid conjugate." Diabetes Metab Res Rev 17(1): 44-50.

Brownlee, M. (2005). "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism." Diabetes 54(6): 1615-1625.

Brun, R. P., J. B. Kim, et al. (1996). "Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade." Curr Opin Cell Biol 8(6): 826-832.

Bullo, M., P. Casas-Agustench, et al. (2007). "Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet." Public Health Nutr 10(10A): 1164-1172.

Cai, W., Q. D. Gao, et al. (2002). "Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction." Mol Med 8(7): 337-346.

Cassese, A., I. Esposito, et al. (2008). "In skeletal muscle advanced glycation end products

(AGEs) inhibit insulin action and induce the formation of multimolecular complexes including the receptor for AGEs." J Biol Chem 283(52): 36088-36099.

Ceriello, A., A. Morocutti, et al. (2000). "Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy." Diabetes 49(12): 2170-2177.

Chabot, C., G. Massicotte, et al. (1997). "Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats." Brain Res 768(1-2): 249-256.

Chakravarthy, M. V. and F. W. Booth (2004). "Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases." J Appl Physiol 96(1): 3-10.

Colantuoni, C., P. Rada, et al. (2002). "Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence." Obes Res 10(6): 478-488.

Cole, A. R., A. Astell, et al. (2007). "Molecular connexions between dementia and diabetes." Neurosci Biobehav Rev 31(7): 1046-1063.

Coleman, E., R. Judd, et al. (2004). "Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS." Glia 48(2): 166-178.

Coleman, E. S., J. C. Dennis, et al. (2010). "Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration." Brain Res 1306: 131-141.

Corominas, M., C. Roncero, et al. (2007). "Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction." Neuropsychobiology 55(1): 2-13.

Costa, L. A., L. H. Canani, et al. (2004). "Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in Type 2 diabetes." Diabet Med 21(3): 252-255.

da Silva, R. S., V. L. Machado, et al. (1984). "Insulin binding sites and action in the adrenal glands from normal and streptozotocin diabetic rats." Horm Metab Res 16 Suppl 1: 77-81.

Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol 65(1): 1-105.

Darley-Usmar, V. and B. Halliwell (1996). "Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system." Pharm Res 13(5): 649-662.

Dennis, J. C., E. S. Coleman, et al. (2005). "Changes in mitotic rate and GFAP expression in the primary olfactory axis of streptozotocin-induced diabetic rats." J Neurocytol 34(1-2): 3-10.

Despres, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." Nature 444(7121): 881-887.

Dheen, S. T., S. S. Tay, et al. (1994). "Arginine vasopressin- and oxytocin-like

immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei of streptozotocin-induced diabetic rats." Arch Histol Cytol 57(5): 461-472.

Diniz, Y. S., A. A. Fernandes, et al. (2004). "Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue." Food Chem Toxicol 42(2): 313-319.

Dringen, R. (2000). "Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration." Eur J Biochem 267(16): 4903.

Dringen, R., J. M. Gutterer, et al. (2000). "Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species." Eur J Biochem 267(16): 4912-4916.

Druce, M. R. and S. R. Bloom (2006). "Oxyntomodulin : a novel potential treatment for obesity." Treat Endocrinol 5(5): 265-272.

Duan, S., C. M. Anderson, et al. (1999). "Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST." J Neurosci 19(23): 10193-10200.

Ebbeling, C. B., K. B. Sinclair, et al. (2004). "Compensation for energy intake from fast food among overweight and lean adolescents." JAMA 291(23): 2828-2833.

Eble, A. S., S. R. Thorpe, et al. (1983). "Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of protein." J Biol Chem 258(15): 9406-9412.

Eng, L. F. and R. S. Ghirnikar (1994). "GFAP and astrogliosis." Brain Pathol 4(3): 229-237.

Farese, R. V., M. P. Sajan, et al. (2005). "Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes." Exp Biol Med (Maywood) 230(9): 593-605.

Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature 408(6809): 239-247.

Flood, J. F., M. L. Baker, et al. (1990). "Modulation of memory processing by glutamic acid receptor agonists and antagonists." Brain Res 521(1-2): 197-202.

Forbes, J. M., G. Soldatos, et al. (2005). "Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side". Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes?" Clin Biochem Rev 26(4): 123-134.

Franke, T. F., D. R. Kaplan, et al. (1997). "PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis." Cell 88(4): 435-437.

Gardoni, F., A. Kamal, et al. (2002). "Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats." J Neurochem 80(3): 438-447.

Gedik, C. M. and A. Collins (2005). "Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study." FASEB J 19(1): 82-

84.

Gegelashvili, G. and A. Schousboe (1998). "Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters." Brain Res Bull 45(3): 233-238.

Gerozissis, K. (2008). "Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies." Eur J Pharmacol 585(1): 38-49.

Ghosh, S., G. Kewalramani, et al. (2006). "Induction of mitochondrial nitrate damage and cardiac dysfunction by chronic provision of dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids." Free Radic Biol Med 41(9): 1413-1424.

Gingrich, J. A. (2005). "Oxidative stress is the new stress." Nat Med 11(12): 1281-1282.

Gispén, W. H. and G. J. Biessels (2000). "Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus." Trends Neurosci 23(11): 542-549.

Goldin, A., J. A. Beckman, et al. (2006). "Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury." Circulation 114(6): 597-605.

Goss, J. R., C. E. Finch, et al. (1991). "Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain." Neurobiol Aging 12(2): 165-170.

Grundy, S. M. (2008). "Metabolic syndrome pandemic." Arterioscler Thromb Vasc Biol 28(4): 629-636.

Hansson, E., H. Muyderman, et al. (2000). "Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication." Neurochem Int 37(2-3): 317-329.

Hertz, L. and H. R. Zielke (2004). "Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show." Trends Neurosci 27(12): 735-743.

Hill, J. O., E. L. Melanson, et al. (2000). "Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity." J Nutr 130(2S Suppl): 284S-288S.

Hogg, N., V. M. Darley-Usmar, et al. (1993). "The oxidation of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide." FEBS Lett 326(1-3): 199-203.

Holemans, K., S. Caluwaerts, et al. (2004). "Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus." Am J Obstet Gynecol 190(3): 858-865.

Horani, M. H. and A. D. Mooradian (2003). "Effect of diabetes on the blood brain barrier." Curr Pharm Des 9(10): 833-840.

Hori, O., S. D. Yan, et al. (1996). "The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus." Nephrol Dial Transplant 11 Suppl 5: 13-16.

- Hovatta, I., R. S. Tennant, et al. (2005). "Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice." Nature 438(7068): 662-666.
- Isomaa, B., P. Almgren, et al. (2001). "Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome." Diabetes Care 24(4): 683-689.
- Jackson-Guilford, J., J. D. Leander, et al. (2000). "The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus." Neurosci Lett 293(2): 91-94.
- James, A. M. and M. P. Murphy (2002). "How mitochondrial damage affects cell function." J Biomed Sci 9(6 Pt 1): 475-487.
- Jiang, Z. Y., A. C. Woollard, et al. (1990). "Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation." FEBS Lett 268(1): 69-71.
- Kahn, R., J. Buse, et al. (2005). "The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care 28(9): 2289-2304.
- Kamal, A., G. J. Biessels, et al. (1999). "Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression." Neuroscience 90(3): 737-745.
- Kawamura, M., J. W. Heinecke, et al. (1994). "Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway." J Clin Invest 94(2): 771-778.
- Kelley, D. E., T. M. McKolanis, et al. (2003). "Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab 285(4): E906-916.
- Kim, Y. B., S. E. Nikoulina, et al. (1999). "Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes." J Clin Invest 104(6): 733-741.
- Klaus, S. (1997). "Functional differentiation of white and brown adipocytes." Bioessays 19(3): 215-223.
- Kodl, C. T. and E. R. Seaquist (2008). "Cognitive dysfunction and diabetes mellitus." Endocr Rev 29(4): 494-511.
- Krook, A., M. Bjornholm, et al. (2000). "Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients." Diabetes 49(2): 284-292.
- La Bella, V., F. Valentino, et al. (2007). "Expression and developmental regulation of the cystine/glutamate exchanger (xc-) in the rat." Neurochem Res 32(6): 1081-1090.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.

- Lakka, H. M., D. E. Laaksonen, et al. (2002). "The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men." JAMA 288(21): 2709-2716.
- Lambert, K. G., K. M. Gerecke, et al. (2000). "Activity-stress increases density of GFAP-immunoreactive astrocytes in the rat hippocampus." Stress 3(4): 275-284.
- Landfield, P. W. (1978). "An endocrine hypothesis of brain aging and studies on brain-endocrine correlations and monosynaptic neurophysiology during aging." Adv Exp Med Biol 113: 179-199.
- Lee, W. J., E. H. Koh, et al. (2005). "Obesity: the role of hypothalamic AMP-activated protein kinase in body weight regulation." Int J Biochem Cell Biol 37(11): 2254-2259.
- Lester-Coll, N., E. J. Rivera, et al. (2006). "Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis 9(1): 13-33.
- Levin, B. E. (2000). "The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits." Obes Res 8(4): 342-347.
- Li, Z. G., W. Zhang, et al. (2002). "Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes." Brain Res 946(2): 221-231.
- Lichtenstein, A. H., E. Kennedy, et al. (1998). "Dietary fat consumption and health." Nutr Rev 56(5 Pt 2): S3-19; discussion S19-28.
- Lovell, M. A. and W. R. Markesbery (2007). "Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease." J Neurosci Res 85(14): 3036-3040.
- Lovell, M. A. and W. R. Markesbery (2007). "Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease." Nucleic Acids Res 35(22): 7497-7504.
- Lowell, B. B. and B. M. Spiegelman (2000). "Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis." Nature 404(6778): 652-660.
- Luchsinger, J. A., M. X. Tang, et al. (2004). "Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease." Neurology 63(7): 1187-1192.
- Macdiarmid, J. I., J. E. Cade, et al. (1996). "High and low fat consumers, their macronutrient intake and body mass index: further analysis of the National Diet and Nutrition Survey of British Adults." Eur J Clin Nutr 50(8): 505-512.
- Magarinos, A. M. and B. S. McEwen (2000). "Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress." Proc Natl Acad Sci U S A 97(20): 11056-11061.
- Magistretti, P. J. and L. Pellerin (1999). "Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain." News Physiol Sci 14: 177-182.
- Magistretti, P. J. and L. Pellerin (1999). "Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci

354(1387): 1155-1163.

Mankovsky, B. N., B. E. Metzger, et al. (1996). "Cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus." J Diabetes Complications 10(4): 228-242.

Manschot, S. M., G. J. Biessels, et al. (2007). "Metabolic and vascular determinants of impaired cognitive performance and abnormalities on brain magnetic resonance imaging in patients with type 2 diabetes." Diabetologia 50(11): 2388-2397.

Maritim, A. C., R. A. Sanders, et al. (2003). "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review." J Biochem Mol Toxicol 17(1): 24-38.

Mastrocola, R., F. Restivo, et al. (2005). "Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats." J Endocrinol 187(1): 37-44.

McCarthy, A. D., S. B. Etcheverry, et al. (2001). "Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development." Acta Diabetol 38(3): 113-122.

McGarry, J. D. (2002). "Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes." Diabetes 51(1): 7-18.

McNeill, J. H., H. L. Delgatty, et al. (1991). "Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats." Diabetes 40(12): 1675-1678.

Mekinova, D., V. Chorvathova, et al. (1995). "Effect of intake of exogenous vitamins C, E and beta-carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes." Nahrung 39(4): 257-261.

Melo, S. S., M. R. Arantes, et al. (2000). "Lipid peroxidation in nicotinamide-deficient and nicotinamide-supplemented rats with streptozotocin-induced diabetes." Acta Diabetol 37(1): 33-39.

Messier, C., N. Awad, et al. (2004). "The relationships between atherosclerosis, heart disease, type 2 diabetes and dementia." Neurol Res 26(5): 567-572.

Milagro, F. I., J. Campion, et al. (2006). "Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress." Obesity (Silver Spring) 14(7): 1118-1123.

Misra, H. P. and I. Fridovich (1972). "The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin." J Biol Chem 247(21): 6960-6962.

Miyata, T., N. Ishikawa, et al. (2003). "Carbonyl stress and diabetic complications." Clin Chem Lab Med 41(9): 1150-1158.

Mohamed, A. K., A. Bierhaus, et al. (1999). "The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications." Biofactors 10(2-3): 157-167.

Molteni, R., R. J. Barnard, et al. (2002). "A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning." Neuroscience 112(4):

803-814.

Molteni, R., A. Wu, et al. (2004). "Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor." Neuroscience 123(2): 429-440.

Monnier, V. M. and X. Wu (2003). "Enzymatic deglycation with amadoriase enzymes from *Aspergillus* sp. as a potential strategy against the complications of diabetes and aging." Biochem Soc Trans 31(Pt 6): 1349-1353.

Moreno, L. A., I. Quintela, et al. (2001). "Postprandial triglyceridemia in obese and non-obese adolescents. Importance of body composition and fat distribution." J Pediatr Endocrinol Metab 14(2): 193-202.

Mudaliar, S. (2004). "Intense management of diabetes mellitus: role of glucose control and antiplatelet agents." J Clin Pharmacol 44(4): 414-422.

Murakami, K., T. Kondo, et al. (1989). "Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus." Metabolism 38(8): 753-758.

Must, A. and R. S. Strauss (1999). "Risks and consequences of childhood and adolescent obesity." Int J Obes Relat Metab Disord 23 Suppl 2: S2-11.

Nishikawa, T., D. Edelstein, et al. (2000). "The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications." Kidney Int Suppl 77: S26-30.

Nishikawa, T., D. Edelstein, et al. (2000). "Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage." Nature 404(6779): 787-790.

Orci, L., W. S. Cook, et al. (2004). "Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines." Proc Natl Acad Sci U S A 101(7): 2058-2063.

Orci, L., M. Ravazzola, et al. (1990). "Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia." Proc Natl Acad Sci U S A 87(24): 9953-9957.

Orci, L., R. H. Unger, et al. (1990). "Reduced beta-cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats." J Clin Invest 86(5): 1615-1622.

Ott, A., R. P. Stolk, et al. (1999). "Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study." Neurology 53(9): 1937-1942.

Ott, B. R. (1999). "Cognition and behavior in patients with Alzheimer's disease." J Genet Specif Med 2(3): 63-69.

Ott, C. H., S. Sanders, et al. (2007). "Grief and personal growth experience of spouses and adult-child caregivers of individuals with Alzheimer's disease and related dementias." Gerontologist 47(6): 798-809.

Parrott, M. D. and C. E. Greenwood (2007). "Dietary influences on cognitive function with

- aging: from high-fat diets to healthful eating." Ann N Y Acad Sci 1114: 389-397.
- Peppas, M., J. Uribarri, et al. (2002). "Advanced glycoxidation. A new risk factor for cardiovascular disease?" Cardiovasc Toxicol 2(4): 275-287.
- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." Anal Biochem 83(2): 346-356.
- Petito, C. K., M. C. Chung, et al. (1992). "Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat." Brain Res 569(2): 275-280.
- Pichon, L., J. F. Huneau, et al. (2006). "A high-protein, high-fat, carbohydrate-free diet reduces energy intake, hepatic lipogenesis, and adiposity in rats." J Nutr 136(5): 1256-1260.
- Piotrowski, P., K. Wierzbicka, et al. (2001). "Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants." Folia Neuropathol 39(3): 147-154.
- Pond, C. M. and C. A. Mattacks (1991). "The effects of noradrenaline and insulin on lipolysis in adipocytes isolated from nine different adipose depots of guinea-pigs." Int J Obes 15(9): 609-618.
- Rauscher, F. M., R. A. Sanders, et al. (2001). "Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats." J Biochem Mol Toxicol 15(1): 41-46.
- Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes 37(12): 1595-1607.
- Reaven, G. M. (2004). "Insulin resistance, cardiovascular disease, and the metabolic syndrome: how well do the emperor's clothes fit?" Diabetes Care 27(4): 1011-1012.
- Reaven, G. M. (2005). "Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease." Panminerva Med 47(4): 201-210.
- Revsin, Y., F. Saravia, et al. (2005). "Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes." Brain Res 1038(1): 22-31.
- Riboulet-Chavey, A., A. Pierron, et al. (2006). "Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species." Diabetes 55(5): 1289-1299.
- Richardson, D. K., S. Kashyap, et al. (2005). "Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle." J Biol Chem 280(11): 10290-10297.
- Roberts, C. K., R. J. Barnard, et al. (2006). "Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome." Metabolism 55(7): 928-934.

- Roberts, C. K., D. Won, et al. (2006). "Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men." Diabetes Res Clin Pract 73(3): 249-259.
- Roca, P., A. M. Proenza, et al. (1999). "Sex differences in the effect of obesity on human plasma tryptophan/large neutral amino acid ratio." Ann Nutr Metab 43(3): 145-151.
- Roca, P., A. M. Rodriguez, et al. (1999). "Brown adipose tissue response to cafeteria diet-feeding involves induction of the UCP2 gene and is impaired in female rats as compared to males." Pflugers Arch 438(5): 628-634.
- Rodriguez, A. M., S. Quevedo-Coli, et al. (2001). "Sex-dependent dietary obesity, induction of UCPs, and leptin expression in rat adipose tissues." Obes Res 9(9): 579-588.
- Ronti, T., G. Lupattelli, et al. (2006). "The endocrine function of adipose tissue: an update." Clin Endocrinol (Oxf) 64(4): 355-365.
- Rosen, P., P. P. Nawroth, et al. (2001). "The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society." Diabetes Metab Res Rev 17(3): 189-212.
- Rothstein, J. D., L. Martin, et al. (1994). "Localization of neuronal and glial glutamate transporters." Neuron 13(3): 713-725.
- Ryan, C. M. and M. Geckle (2000). "Why is learning and memory dysfunction in Type 2 diabetes limited to older adults?" Diabetes Metab Res Rev 16(5): 308-315.
- Sandu, O., K. Song, et al. (2005). "Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake." Diabetes 54(8): 2314-2319.
- Saravia, F., Y. Revsin, et al. (2004). "Oestradiol restores cell proliferation in dentate gyrus and subventricular zone of streptozotocin-diabetic mice." J Neuroendocrinol 16(8): 704-710.
- Saravia, F. E., S. L. Gonzalez, et al. (2001). "Diabetes increases the expression of hypothalamic neuropeptides in a spontaneous model of type I diabetes, the nonobese diabetic (NOD) mouse." Cell Mol Neurobiol 21(1): 15-27.
- Saravia, F. E., Y. Revsin, et al. (2002). "Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice." Brain Res 957(2): 345-353.
- Saxena, A. K., P. Srivastava, et al. (1993). "Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate." Biochem Pharmacol 45(3): 539-542.
- Schrauwen, P., A. J. Wagenmakers, et al. (2000). "Increase in fat oxidation on a high-fat diet is accompanied by an increase in triglyceride-derived fatty acid oxidation." Diabetes 49(4): 640-646.
- Seppala-Lindroos, A., S. Vehkavaara, et al. (2002). "Fat accumulation in the liver is associated

with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men." J Clin Endocrinol Metab 87(7): 3023-3028.

Shangari, N., T. S. Chan, et al. (2006). "Glyoxal markedly compromises hepatocyte resistance to hydrogen peroxide." Biochem Pharmacol 71(11): 1610-1618.

Shangari, N., F. Depeint, et al. (2005). "The effects of partial thiamin deficiency and oxidative stress (i.e., glyoxal and methylglyoxal) on the levels of alpha-oxoaldehyde plasma protein adducts in Fischer 344 rats." FEBS Lett 579(25): 5596-5602.

Shangari, N., F. Depeint, et al. (2007). "A thermolyzed diet increases oxidative stress, plasma alpha-aldehydes and colonic inflammation in the rat." Chem Biol Interact 169(2): 100-109.

Shangari, N. and P. J. O'Brien (2004). "The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress." Biochem Pharmacol 68(7): 1433-1442.

Sharma, H. S., C. Zimmer, et al. (1992). "Acute systemic heat stress increases glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in brain: experimental observations in conscious normotensive young rats." Neuroscience 48(4): 889-901.

Sharp, P. S., S. Rainbow, et al. (2003). "Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects." Diabet Med 20(7): 575-579.

Shaw, D. I., W. L. Hall, et al. (2005). "Metabolic syndrome: what is it and what are the implications?" Proc Nutr Soc 64(3): 349-357.

Shepherd, P. R. (2005). "Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues." Acta Physiol Scand 183(1): 3-12.

Simon, G. E., M. Von Korff, et al. (2006). "Association between obesity and psychiatric disorders in the US adult population." Arch Gen Psychiatry 63(7): 824-830.

Slim, R. M., M. Toborek, et al. (1996). "Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats." J Am Coll Nutr 15(3): 289-294.

Smyth, S. and A. Heron (2006). "Diabetes and obesity: the twin epidemics." Nat Med 12(1): 75-80.

Sofroniew, M. V. (2005). "Reactive astrocytes in neural repair and protection." Neuroscientist 11(5): 400-407.

Stein, C. J. and G. A. Colditz (2004). "The epidemic of obesity." J Clin Endocrinol Metab 89(6): 2522-2525.

Studzinski, C. M., F. Li, et al. (2009). "Effects of short-term Western diet on cerebral oxidative stress and diabetes related factors in APP x PS1 knock-in mice." J Neurochem 108(4): 860-866.

Takeuchi, M. and S. Yamagishi (2004). "Alternative routes for the formation of glyceraldehyde-derived AGEs (TAGE) in vivo." Med Hypotheses 63(3): 453-455.

- Teegarden, S. L. and T. L. Bale (2007). "Decreases in dietary preference produce increased emotionality and risk for dietary relapse." Biol Psychiatry 61(9): 1021-1029.
- Terauchi, Y., I. Takamoto, et al. (2007). "Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance." J Clin Invest 117(1): 246-257.
- Thomazi, A. P., G. F. Godinho, et al. (2004). "Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine." Mech Ageing Dev 125(7): 475-481.
- Thornalley, P. J. (2005). "Glycation free adduct accumulation in renal disease: the new AGE." Pediatr Nephrol 20(11): 1515-1522.
- Thornalley, P. J., S. Battah, et al. (2003). "Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry." Biochem J 375(Pt 3): 581-592.
- Thornalley, P. J., A. Langborg, et al. (1999). "Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose." Biochem J 344 Pt 1: 109-116.
- Tice, R. R., E. Agurell, et al. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." Environ Mol Mutagen 35(3): 206-221.
- Tiehuis, A. M., Y. van der Graaf, et al. (2008). "Diabetes increases atrophy and vascular lesions on brain MRI in patients with symptomatic arterial disease." Stroke 39(5): 1600-1603.
- Tiehuis, A. M., K. L. Vincken, et al. (2008). "Cerebral perfusion in relation to cognitive function and type 2 diabetes." Diabetologia 51(7): 1321-1326.
- Trendelenburg, G. and U. Dirnagl (2005). "Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning." Glia 50(4): 307-320.
- Trumpower, B. L. (1990). "The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex." J Biol Chem 265(20): 11409-11412.
- Tsacopoulos, M. and P. J. Magistretti (1996). "Metabolic coupling between glia and neurons." J Neurosci 16(3): 877-885.
- Unger, R. H. and L. Orci (2001). "Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders." FASEB J 15(2): 312-321.
- Uribarri, J., W. Cai, et al. (2007). "Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging." J Gerontol A Biol Sci Med Sci 62(4): 427-433.
- Uribarri, J., W. Cai, et al. (2005). "Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects." Ann N Y Acad Sci 1043: 461-466.

- Valastro, B., J. Cossette, et al. (2002). "Up-regulation of glutamate receptors is associated with LTP defects in the early stages of diabetes mellitus." Diabetologia 45(5): 642-650.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol 39(1): 44-84.
- van der Heide, L. P., G. M. Ramakers, et al. (2006). "Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive." Prog Neurobiol 79(4): 205-221.
- Vlassara, H. (2001). "The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications." Diabetes Metab Res Rev 17(6): 436-443.
- Vlassara, H. and M. R. Palace (2002). "Diabetes and advanced glycation endproducts." J Intern Med 251(2): 87-101.
- Wada, A., H. Yokoo, et al. (2005). "New twist on neuronal insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics." J Pharmacol Sci 99(2): 128-143.
- Walker, B. R., A. A. Connacher, et al. (1995). "Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation." J Clin Endocrinol Metab 80(11): 3155-3159.
- Walker, O., M. Strong, et al. (2007). "A qualitative study of primary care clinicians' views of treating childhood obesity." BMC Fam Pract 8: 50.
- Wallace, D. C., J. M. Shoffner, et al. (1992). "Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease." Ann Neurol 32(1): 113-114.
- Ward, M. M., A. I. Jobling, et al. (2005). "Glutamate uptake in retinal glial cells during diabetes." Diabetologia 48(2): 351-360.
- Weisburger, J. H. (1997). "Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies." J Am Diet Assoc 97(7 Suppl): S16-23.
- White, M. K. and D. S. Strayer (2002). "Survival signaling in type II pneumocytes activated by surfactant protein-A." Exp Cell Res 280(2): 270-279.
- Whiting, S., P. Camfield, et al. (1997). "Insulin-dependent diabetes mellitus presenting in children as frequent, medically unresponsive, partial seizures." J Child Neurol 12(3): 178-180.
- Whiting, W. L. t. and A. D. Smith (1997). "Differential age-related processing limitations in recall and recognition tasks." Psychol Aging 12(2): 216-224.
- Wild, S., G. Roglic, et al. (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." Diabetes Care 27(5): 1047-1053.
- Wilhelmsson, U., E. A. Bushong, et al. (2006). "Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury." Proc Natl Acad Sci U S A 103(46): 17513-17518.

- Winocur, G., C. E. Greenwood, et al. (2005). "Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity." Behav Neurosci 119(5): 1389-1395.
- Winyard, P. G., C. J. Moody, et al. (2005). "Oxidative activation of antioxidant defence." Trends Biochem Sci 30(8): 453-461.
- Xu, H., G. T. Barnes, et al. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." J Clin Invest 112(12): 1821-1830.
- Yaffe, K., T. Blackwell, et al. (2004). "Diabetes, impaired fasting glucose, and development of cognitive impairment in older women." Neurology 63(4): 658-663.
- Zhang, N., M. Komine-Kobayashi, et al. (2005). "Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain." Stroke 36(10): 2220-2225.
- Zhang, X., F. Dong, et al. (2005). "High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex." Exp Neurol 191(2): 318-325.
- Zhao, D., M. M. Zhang, et al. (2008). "[Effect of blood pressure status changes from childhood to adulthood on hypertension related cardiac-renal function in adulthood]." Zhonghua Er Ke Za Zhi 46(10): 763-768.
- Zonta, M., M. C. Angulo, et al. (2003). "Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation." Nat Neurosci 6(1): 43-50.