



# **Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados PUFASs en la evolución de la diabetes espontánea en un modelo animal con énfasis en la encefalopatía deabética (ED)**

**Gustavo Tomás Díaz.**

Tesis - Doctor en Medicina y Cirugía - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas, 2015.

Aprobada: 2015

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados PUFASs en la evolución de la diabetes espontánea en un modelo animal con énfasis en la encefalopatía deabética (ED) by Gustavo Tomás Díaz is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**FCM**  
Facultad de  
Ciencias Médicas

## TRABAJO DE TESIS DOCTORAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA :

**"Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados PUFAS<sub>s</sub> en la evolución de la diabetes espontánea en un modelo animal con énfasis en la encefalopatía diabética (ED)"**

**Médico cirujano Gustavo Tomás Díaz**

**Trabajo realizado en la Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba y en el Instituto en Ciencias de la Salud (CONICET-UNC) Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba**

**Córdoba ,Agosto 2015**

## **COMISIÓN DE TESIS**

**DIRECTOR :**

**- PROF Dr. ALDO RENATO EYNARD**

**MIEMBROS ASESORES :**

**- PROF Dra. PAULA S DE MERESHIAN**

**- PROF Dra. CRISTINA LÓPEZ**

***DEDICADO A :***

**A mi familia y a mis pacientes**

**"LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA  
CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS."**

**(art.30 del reglamento para la carrera de Doctorado en Medicina y  
Cirugía)**

## AGRADECIMIENTOS

Más allá del esfuerzo personal, el trabajo de tesis, solo es posible en el marco de un trabajo grupal y en el marco de una institución como es el Instituto Nacional en Ciencias de la Salud (CONICET-UNC).

Al Prof. Dr. Aldo R Eynard a quien debo su permanente inspiración, consejo y ayuda desde el año 1977.

Se agradece a la Fundación de la Facultad de Ciencias Médicas de laUNC y a la Fundación Grupo Amigos de los Diabéticos (personería jurídica 231) por sus aportes económicos para la realización de la presente tesis.

Este estudio se realizó gracias a la colaboración de los Prof. Dr Gastón Repposi, Prof. Alejandro Dain, a la Prof. Dra María Eugenia Pasqualini, la Prof. Dra. Patricia Quiroga, la Prof, Dra Andrea Comba , la lic Gina Mazzudulli y el Sr Ricardo Matos a quienes agradezco su importante colaboración.

Al equipo de bioquímicas del Sanatorio Punilla de la ciudad de Villa Carlos Paz encabeza por la Bioq Cristina Díaz y Daniela Rossi quienes gentilmente colaboraron con los análisis bioquímicos de este trabajo.

A la Prof Dra María Cristina Tarres y col por el aporte de las ratas e-SS y su valiosa colaboración

Al Prof. Dr Gerardo Gatti de la Fundación Para la Salud de la ciudad de Córdoba por su ayuda en la realización de la citometría de flujo.

A las secretarias Yanet Alvarez y Marcela Carranza.

Al Prof. Ricardo Fretes y su equipo de trabajo

A la Prof. Ana de Paul por su ayuda en los estudios de microscopía.

Un especial agradecimiento a las Prof Dra Paula S de Mersshian y a la Dra Cristina López.

Se agradece muy especialmente al Prof. Das Undurti por su permanente colaboración al Dr. Luis Alberto Rulli y a la Prof. Dra Mirta Valentich.

El Agradecimiento es poco para la ayuda recibida, si expreso mi compromiso por el trabajo en bien de las personas.

# ÍNDICE

Resumen.....	10
Summary.....	12
<b>Capítulo1Introducción.....</b>	<b>14</b>
1.1 Marco del Estudio .....	14
1.2 Ácidos grasos .....	16
1.2.1 Química y Metabolismo.....	16
1.2.2 Propiedades.....	16
1.2.3 Denominación.....	16
1.2.4 Clasificación y principales características fisicoquímicas de los AG .....	17
1.2.5 Las Membranas Celulares, su estructura.....	21
1.2.6 Acciones biológicas los PUFAs.....	22
1.2.7 Acción antiinflamatoria del ácido docosahexaenoico DHA.....	23
1.2.8 El papel de los PUFAs en el SNC.....	24
1.2.9 El papel del DHA en la función neuronal.....	25
1.2.10 Los lípidos y su relación con los mecanismos moleculares normales y alterados de la acción de la insulina.....	25
1.3 Inflamación.....	26
1.3.1 Inflamación y Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).....	26
1.3.2 Inflamación e Insulinorresistencia (IR).....	27
1.3.3 Inflamación y Síndrome Metabólico (SM).....	28
1.3.4 Inflamación y diabetes.....	28
1.3.5 Los PUFAs , su relación con el síndrome metabólico (SM)	

y la inflamación .....	29
1.4 Diabetes y Deterioro Cognitivo.....	31
1.4.1 Hipertrigliceridemia e hiperglucemia y deterioro cognitivo.....	31
1.4.2 PUFAs omega 3 y deterioro cognitivo (DC).....	32
1.5 Apoptosis.....	33
1.5.1 Apoptosis y Ácidos Grasos Libres (AGL).....	33
1.5.2 Apoptosis neuronal y aceite pescado.....	33
1.6 Sinapsis y aceite de pescado.....	34
1.7 Los modelos animales utilizados en este trabajo.....	34
<b>Capítulo 2 Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>36</b>
2.1 Hipótesis.....	36
2.2 Objetivos.....	36
2.2.1 Objetivo general.....	36
2.2.2 Objetivos particulares.....	36
<b>Capítulo 3 Materiales y Métodos.....</b>	<b>37</b>
3.1 Consideraciones Éticas.....	37
3.2 Materiales y equipamiento.....	37
3.2.1 Animales.....	37
3.2.2- Equipamiento y Factibilidad.....	37
3.2.3- Reactivos.....	37
3.3.4- Diseño experimental .....	38
3.3 Estudios Realizados.....	40
3.3.1 Marcadores Clínicos.....	40

3.3.1	Peso Corporal.....	41
3.3.2	Sobrevida Animal.....	41
3.3.	Estudio de la conducta animal. "Hole Board Test".....	41
3.3	Estudio de Diagnóstico por imagen. Tomografía Axial Computada.....	45
3.3	Determinaciones Bioquímicas: .....	45
3.3.1	Obtención de las muestras.....	45
3.3.2	Parámetros relacionados con la glucemia.....	47
3.3.2.1	Glucemia en Ayunas.....	47
3.3.2.2	Prueba de Tolerancia oral a la Glucosa.....	48
3.3.2.3	Hemoglobina Glicosilada.....	48
3.3.3.	Estudio de los lípidos.....	48
3.3.3.1	Estudio del Colesterol Total.....	48
3.3.3.2	Estudio de los Triglicéridos.....	48
3.3.3.3	Estudio de los Ácidos Grasos por Cromatografía de Gases.....	48
3.3.4	Parámetros relacionados con la inflamación.....	48
3.3.4.1	PCR Ultrasensible.....	48
3.3.4.2	IL-6 en Plasma e Hipocampo.....	48
3.3.5	Parámetros relacionados con el estrés oxidativo.....	49
3.3.5.1 y 3.3.5.2	Gama Glutamyltranspeptidasa en Plasma y Cerebro.....	49
3.3.5.3	Lipoperóxidos.....	49
3.3.5.4	Hidroperóxidos.....	49
3.3.5	Parámetros relacionados con la apoptosis.....	50
3.3.5.1	Citometría de Flujo.....	50



3.3.5.2 TUNEL.....	50
3.4 Estudios Morfológicos y Morfométricos .....	50
3.4.1 Microscopía óptica.....	50
3.4.2 Inmunohistoquímica.....	54
3.5 Análisis estadístico .....	56
<b>Capítulo 4 Resultados.....</b>	<b>57</b>
4.4.2.3 Cromatografía de Gases.....	57
Tabla 2 .....	58
4.1 Marcadores Clínicos.....	59
4.1.1 Peso Corporal (Fig.29).....	59
4.1.2 Estudio de la conducta animal."Hole Board Test" (Fig.30).....	60
4.1.3 Sobrevida Animal (Fig. 31).....	62
4.2 Estudio de Diagnóstico por imágenes.TomografíaAxialComputada (Fig 32)..	63
4.3 Determinaciones Bioquímicas: .....	64
4.3.1 Parámetros relacionados con la glucemia.....	64
4.3.1.1 Glucemia en Ayunas (Fig. 33).....	64
4.3.1.2 Curva de Tolerancia oral a la Glucosa (Fig. 33).....	64
4.3.1.3 Hemoglobina Glicosilada (Fig. 34).....	65
4.3.2 Parámetros relacionados con el metabolismo lipídico.....	66
4.3.2.2 Trigliceridemia (Fig.35 A).....	66
4.3.2.3 Colesterolemia (Fig.35 B).....	66
4.3.3 Parámetros relacionados con la inflamación.....	67
4.3.3.1 PCR Ultrasensible (Fig. 36).....	67

4.3.3.2 IL-6 en Plasma e Hipocampo (Fig. 37).....	68
4.3.4 Parámetros relacionados con el estrés oxidativo.....	69
4.3.4.1 y 4.3.4.2.Gama Glutamyltranspeptidasa en Plasma y Cerebro (Fig. 38)...	69
4.3.4.3 y 4.3.4.4Lipoperóxidos Hidroperóxidos (Fig. 39).....	70
4.3.5 Parámetros relacionados con la apoptosis.....	71
4.3.5.1Citometría de Flujo (Fig. 40).....	71
4.3.5.2 TUNEL (Fig. 41).....	72
4.4 Estudios morfológicos y Morfométricos.....	73
4.4.1 Estudio de la Sustancia Blanca (Fig. 42).....	73
4.4.2 Estudio de la zona CA1 del Hipocampo H-E (Fig.43).....	74
4.4.3 Estudio de la zona CA1 del Hipocampo Nissl (Fig.44).....	75
4.4.4 Estudio del Giro Dentado H-E (Fig.46).....	76
4.4.5 Inmunohistoquímica Marcación de Sinaptofisina (Fig.47).....	77
<b>Capítulo 5 Discusión.....</b>	<b>78</b>
<b>Capítulo 6 Conclusiones.....</b>	<b>85</b>
<b>Capítulo 7 Glosario de Abreviaturas.....</b>	<b>86</b>
<b>Capítulo 9 Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>88</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>99</b>
1-Apéndice 1 Cognitive and motor perturbations in elderly with longstanding diabetes mellitus.....	100
2-Apéndice 2 $\omega$ -3 fatty acid plus antiinflammatory treatment ameliorates diabetic encephalopathy (ED) related glycolipotoxicity in a diabetic spontaneous rat model. ....	112
3-Apéndice 3 Programa de Extensión "Aprendiendo a Vivir" .....	143

## Resumen

Ante la creciente prevalencia de pacientes añosos con diabetes tipo 2 (DBT2) y encefalopatía diabética (ED) cuyos signos cardinales son trastornos cognitivos, es que surgió nuestro interés de identificar y caracterizar un modelo experimental de ED en ratas. Asimismo, que en dicho modelo murino pudiesemos implementar variables experimentales que modificasen favorablemente la historia natural de la DBT2, a través del aporte exógeno de ciertos PUFAs, con y sin antiinflamatorios.

### Objetivo:

- Determinar si en las ratas e-SS, una cepa de ratas Wistar estabilizada que en su adultez espontáneamente desarrollan diabetes muy semejante al tipo 2 (DBT2), se produce también una condición neuropatológica compatible con encefalopatía diabética (ED).
- Evaluar si la administración de PUFAs  $\omega$ 3,  $\omega$ 6 y del compuesto antiinflamatorio extraído de nuestra flora nativa, el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), modula diferencialmente la glicolipotoxicidad relacionada con la ED.

### Materiales, métodos y diseño experimental:

Se utilizaron 138 ratas machos en total: 100 Stillman-Salgado (e-SS) que desarrollan espontáneamente DBT2 y 38 ratas Wistar (control no diabético). Los animales e-SS recibieron al mes de vida por vía intraperitoneal (IP) ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)  $\omega$ 3 o  $\omega$ 6 con o sin NDGA, administrándose solo solución fisiológica a otro grupo e-SS (control diabético) y al grupo Wistar (control no diabético). Los parámetros estudiados fueron: peso, glucemia, prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), hemoglobina glicosilada (HbA1c), colesterol (Ch), triglicéridos (TG), los perfiles de ácidos grasos por GC en plasma y tejido cerebral. Los marcadores de estrés oxidativo fueron la actividad de la enzima gama glutamil transpeptidasa (GGT), hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. Asimismo se determinaron algunos marcadores característicos de inflamación crónica: proteína C reactiva (CRP) ultrasensible e interleucina-6 (IL-6). En el 6<sup>o</sup> y 12<sup>o</sup> mes de edad se realizó a los animales una prueba conductual llamada "Hole Board Test" (o Prueba del Hueco). En el 12<sup>o</sup> mes, se efectuó una tomografía computarizada de cerebro (TAC), análisis histopatológicos, estudio de la apoptosis del hipocampo mediante citometría de flujo y técnica del TUNEL y la determinación inmuno histoquímica de sinaptofisina, macromolécula integral de las membranas presinápticas, que es crucial para la función sináptica.

## Resultados:

Los animales diabéticos tratados con  $\omega 3$  tuvieron un mejor desempeño en la prueba de comportamiento (Hole Test) al año de edad, en comparación con los otros grupos diabéticos. El estudio tomográfico mostró mayor heterogeneidad de la sustancia blanca, indicativo de lesión en los grupos e-SS Control y también en el grupo  $\omega 6$ . Las ratas e-SS control mostraron un aumento de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y una disminución relativa en los PUFAs  $\omega 3$  y  $\omega 6$  en plasma, en comparación con los otros grupos ( $p < 0,05$ ). En plasma y cerebro, los animales e-SS a los 12 meses mostraron niveles más altos de los parámetros de estrés oxidativo, mientras que los animales tratados con  $\omega 3$ , solo o con el agregado de NDGA, se asemejaron a los controles no diabéticos (Wistar). En las ratas e-SS control se registró aumento de los niveles de IL-6 en hipocampo y plasma en tanto que esos valores fueron menores en los animales Wistar (control no diabético) y en aquellos que recibieron NDGA. En las ratas e-SS control y en las tratadas con  $\omega 6$ , la histopatología reveló mayor espongirosis, disminución anómala del espesor de la zona CA1 del hipocampo y mayor dispersión celular que en los otros grupos. En los animales que recibieron PUFAs  $\omega 3$  observamos un aumento de la expresión de sinaptofisina, acercándose dicha marcación a la observada en el lote Wistar control no diabético.

## Conclusiones:

Basados en los hallazgos neurocognitivos, morfológicos y moleculares originales surgidos de este trabajo concluimos que la rata diabética e-SS desarrolla DE y la proponemos como un adecuado modelo para el estudio experimental de esa condición neurodegenerativa. Además, la fisiopatología que observamos se asocia con alteración de marcadores de glicolipototoxicidad, inflamación y estrés oxidativo. Los animales tratados con  $\omega 3$ , sumado al NDGA, mostraron una mejoría significativa de estos parámetros alterados, acercándose los mismos a los valores registrados en los controles sanos (Wistar). Nuestros resultados indican que los PUFAs  $\omega 3$  junto con el antiinflamatorio NDGA, protegen el Sistema Nervioso Central (SNC), así como a sus funciones neurocognitivas y neuromotrices, en los animales diabéticos. A su vez, queda planteado el eventual daño que pueden ocasionar el exceso de  $\omega 6$ , para futuras investigaciones. Se abren así posibilidades auspiciosas para sugerir la suplementación de  $\omega 3$  y antiinflamatorios para prevenir, y visto que pueden remitir el curso de la ED, se podría aún proponer su suplementación como una coadyuvancia en el tratamiento de la ED, enmarcado ello en prácticas nutricionales saludables.

## Summary

Increased prevalence of diabetic encephalopathy (DE) is now frequently seen in elderly patients suffering of longstanding diabetes mellitus type 2 (DBT2) being subtle and progressive cognitive disorders the key signs for the diagnosis of this pathological condition. Were our aims to identify and to characterize a suitable experimental model of DE using a stabilized strain, Wistar derived, of spontaneously diabetic rats named eSS. Thus, in the e-SS murine model our proposes were to assay some experimental conditions, as the addition of certain PUFAs alone or plus antiinflammatory agents in order to establish whether the ethiopathology and natural course of DBT2 and its linked ED would be significantly prevented and improved.

### Objectives:

To determine whether in e-SS rats, which become spontaneously diabetic at maturity in a way alike DBT2, DE is also developed.

To assay the differential effects of exogenous administration of certain  $\omega$ 3,  $\omega$ 6 PUFAs, with and without the addition of the anti-inflammatory nordihydroguaiaretic acid (NDGA), on the well-known glycolipotoxicity linked to DE.

### Materials, methods and experimental design:

We used male rats, 100 spontaneous diabetic e-SS, and 38 Wistar, as healthy controls. Animals received monthly mixtures enriched in  $\omega$ 3 or  $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), with or without NDGA added, by intraperitoneal route (IP) whereas other group of e-SS and Wistar received only saline. Recorded parameters were: weight, glycemia, oral glucose tolerance test (OGTT), glycated hemoglobin (HbA1c), cholesterol (Ch), triglycerides (TG), plasma and brain tissues fatty acid profiles, gamma glutamyltranspeptidase (GGTP), hydroperoxides and lipoperoxides assays. Reliable markers of chronic inflammation as C Reactive Protein (CRP) ultrasensitive and Interleukin-6 (IL-6) were tested as well. At 6<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> month of age rats performed a well known behavioral test named *Hole Test*. At 12<sup>th</sup> month, Computed Tomography (CT), histopathological studies, counting of hippocampal cell apoptosis and LH synaptophysin marcation, being this a key integral glycoprotein of presynaptic membranes, were assayed as well.

### Results:

$\omega$ 3 supplemented animals performed better in Hole test at 12<sup>th</sup> month age than the behavior recorded for the other, treated and non treated diabetic rats. In the former CT showed images closely similar to Wistar controls. In addition, CT pictures showed abnormal heterogeneity in brain tissue, which were more severe in e-SS Control and  $\omega$ 6 treated groups. Control diabetic rats showed increased MUFAs along with a relative deficiency in  $\omega$ 3 and  $\omega$ 6 PUFAs compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). e-SS rats at 12 months showed higher levels of oxidative

stress markers in plasma and brain tissue, whereas  $\omega$ 3+NDGA treated animals exhibited decreased values. Control e-SS rats had increased IL-6 values in hippocampus and plasma, facts which were ameliorated in NDGA treated animals. In Control e-SS and  $\omega$ 6 treated rats, spongiosis, abnormal hippocampal CA1 zone thickness and high cell dispersion was recorded regarding the other diabetic groups. Interestingly,  $\omega$ 3 groups had increased expression of synaptophysin being this finding a suitable marker of adequate sinapsis indemnity.

#### Conclusions:

Present research gives original data about neurocognitive , morphological and molecular perturbations which are compatible with the DE condition in DBT2 e-SS rats. Hence, we proposed this model (e-SS rat) as a suitable tool to study the ethiopathology of DE.

In addition, we observed that DE pathophysiology was associated with increased glicolipototoxicity, chronic inflammation and increased oxidative stress markers. Furthermore, whereas the major markers of DBT2 and the linked DE were higher in e-SS non treated rats, those animal supplemented with  $\omega$ 3 + NDGA showed the better improvement of the altered parameters, being its values approaching to those observed in healthy controls (Wistar ). On the contrary, w6 supplementation seems to be a bit noxious so opening new ways to search about the adequate nutritional balance w3/w6. These work brings original data giving support to reasonable bases to explain how  $\omega$ 3 PUFAs and NDGA may protect diabetic aged brain thus opening further ways for searching in the prevention and even treatment of ED in elderly patients.

# CAPITULO 1: INTRODUCCION

## 1.1 Marco del estudio

La diabetes tipo 2 (DBT2) es una enfermedad crónica que altera diversos sistemas metabólicos, ocasionando un deterioro multisistémico progresivo. Actualmente existe un incremento en su incidencia y prevalencia a nivel global convirtiéndola en una condición epidémica (1). Ello está vinculado con la adopción de hábitos alimentarios perjudiciales y disminución de la actividad física, entre otros factores ambientales.

Los pacientes con DBT2 han logrado una significativa extensión de la expectativa de vida comparado con lo que sucedía décadas atrás. Ello se debe a la mejora en los tratamientos como son la eficiente aplicación de la insulina, los antidiabéticos orales, la adecuada nutrición, énfasis en la actividad física y especialmente, a una correcta educación diabetológica y nutricional. Este conjunto de acciones no solo permitieron una mayor sobrevida, ya que ahora la expectativa de vida no difiere de la persona no diabética, sino que también facilitaron, paradójicamente, la aparición de complicaciones tardías. Una muy importante es la encefalopatía diabética (ED), que se caracteriza por ser un proceso patológico crónico, silente en sus comienzos con afectación cognitiva, sensitiva, motora, del equilibrio, la marcha, atrofia cerebral y cambios histopatológicos definidos (2).

Los ácidos grasos poliinsaturados PUFAs\*, especialmente los de la familia  $\omega 3$  y  $\omega 6$ , constituyen componentes indispensables de la alimentación y por ello son ácidos grasos esenciales (AGE). Los ácidos grasos (AG), entre otras importantes funciones forman parte de los fosfolípidos y otras moléculas que componen a su vez la bicapa de las membranas de las células otorgándoles fluidez, sitio para moléculas transportadoras como el de la glucosa, la ubicación y función de los receptores de membrana, y sus desequilibrios conducen a complicaciones adversas en los fenómenos de endo y exocitosis, participando también en la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis. Los PUFAs en particular inciden en la conformación de redes neuronales, de ahí su importancia en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), lo cual está asociado a las funciones superiores del intelecto (3). Los PUFAs participan también en el mantenimiento del tono vascular y permeabilidad de la microvasculatura (3). Algunos PUFAs, entre ellos el ácido araquidónico (AA) de la familia  $\omega 6$  y los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) de la familia  $\omega 3$ , son precursores de lípidos bioactivos, con intensa actividad pro-inflamatoria y antiinflamatoria, según la conformación de su molécula entre ellos los eicosanoides, leucotrienos, endocannabinoides y lipoxinas, ver Figura N1 (4).

\* nota es este caso, como en otros semejantes, se empleará la abreviatura en inglés consagrada por el uso.

## METABOLISMO DE LOS PRINCIPALES PUFAs

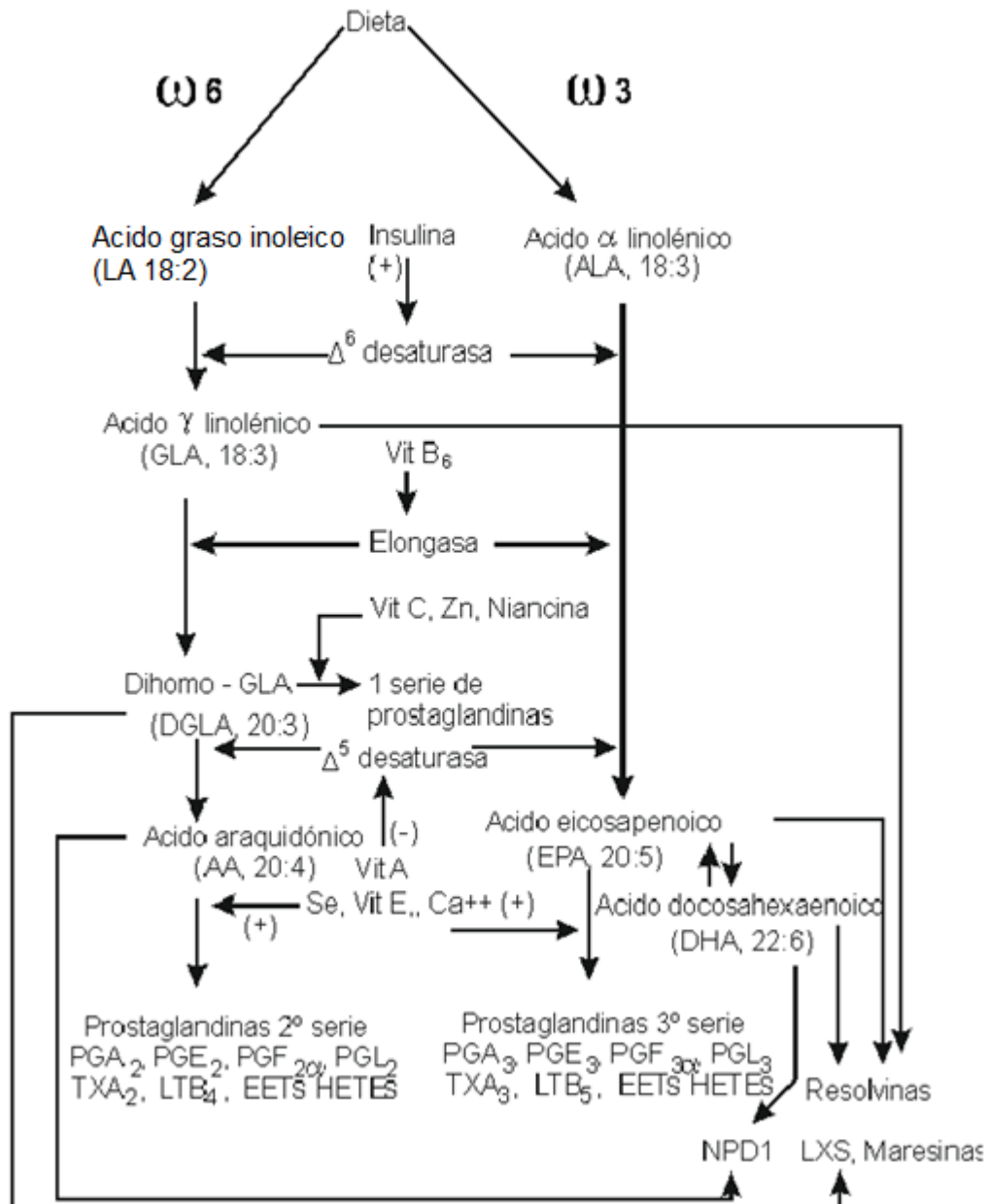


Fig. 1 Metabolismo de los PUFAs  $\omega$  3 y  $\omega$  6 y sus principales metabolitos bioactivos (gentileza de la Prof. María Eugenia Pasqualini tomada de una clase teórica)



## 1.2 Ácidos Grasos (AG)

### 1.2.1 Química y Metabolismo

Los AG son ácidos carboxílicos de estructura R-COOH, donde R es una cadena hidrocarbonada lineal. Esta cadena puede contener únicamente enlaces covalentes simples entre sus C, como sucede con los AG, o contener generalmente uno, dos o más dobles enlaces entre átomos de carbono siendo estos los AG insaturados.

Pueden encontrarse libres, formando TG o formando parte de fosfolípidos. En mamíferos, la mayor proporción de AG se encuentran en forma de TG, moléculas donde los grupos carboxílico (-COOH) de tres ácidos grasos se esterifican con cada uno de los grupos hidroxilos (OH) del glicerol. Se almacenan principalmente en adipocitos y hepatocitos (5). Los fosfolípidos (FL) están constituidos por dos AG que esterifican las posiciones 1 y 2 del glicerol; en la posición 3 a través de una unión fosfo diéster se unen diferentes grupos que confieren la identidad del FL: fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina o ácido fosfatídico.

Los AG cumplen tres funciones básicas:

#### 1. Estructural

**2. Calórica**, son un componente de la grasa almacenada en la forma de triglicéridos en el tejido adiposo y en el hepático

**3. Fisiológica**, son precursores para la síntesis de numerosos lípidos bioactivos y otras moléculas y son así moduladores de diversos procesos metabólicos, entre ellos la inflamación.

Los AG que no contienen enlace dobles carbono-carbono se denominan saturados, los que contienen un enlace doble son los AG insaturados (MUFA) y los AG con dos o más insaturaciones, se llaman poliinsaturados (PUFAs).

### 1.2.2 Propiedades

Tanto los ácidos AG libres como los FL son moléculas anfipáticas: disponen de una región apolar hidrofóbica (la cadena hidrocarbonada) insoluble en agua y una región polar hidrofílica (el grupo carboxilo en el AG libre, o el grupo polar, en fosfolípidos) soluble en agua.

### 1.2.3 Denominación

Hay dos notaciones más empleadas, ambas válidas para denominar los AG, según:

-Números Árabigos

Comenzando a contar desde el carbono carboxílico (-COOH), que recibe el número 1C, el carbono 2 es el que queda inmediatamente tras el 1 y así sucesivamente.

-Alfabeto Griego

Se denominan desde el carbono 2, con letra  $\alpha$ ; al carbono 3 la letra  $\beta$ . Al último carbono, el del extremo metilo (CH<sub>3</sub>-), se le asigna la letra  $\omega$ . Los AG se

identifican por , el número de átomos de carbono seguido por dos puntos y por el número de dobles enlaces; la localización de los mismos se designa , contando a partir del extremo carboxílico (5-7).

#### 1.2.4 Clasificación y principales características fisicoquímicas de los AG :

-Ácidos grasos cis. Son AG insaturados, en los cuales los dos átomos de hidrógeno del doble enlace están en el mismo lado de la molécula, lo que le confiere un "codo" en el punto donde está el doble enlace. Por ejemplo, el DHA (ácido docohexaenoico,  $\omega$ 3, 22:6) es principalmente abundante en los peces de aguas frías. Casi todos los PUFAs con actividad biológica tienen sus dobles ligaduras en posición cis.

-Ácidos grasos trans. Son AG insaturados en los cuales los dos átomos de hidrógeno están ubicados, uno a cada lado del doble enlace, lo que torna a la molécula rectilínea. (8-10).

-Ácidos grasos saturados. Sin dobles enlaces entre carbonos; forman cadenas extendidas y son sólidos a temperatura ambiente, excepto los de cadena corta.

-Cadena corta (volátiles):

-Ácido butírico (ácido butanoico).

-Ácido isobutírico (ácido 2-metilpropionico).

-Ácido valérico (ácido pentanoico).

-Ácido isovalérico (ácido 3-metilbutanoico).

-Cadena larga (abundantes en la leche materna):

-Ácido mirístico, 14:0 (ácido tetradecanoico).

-Ácido palmítico, 16:0 (ácido hexadecanoico).

-Ácido esteárico, 18:0 (ácido octadecanoico).

-Ácidos grasos insaturados. Tienen dobles enlaces entre carbonos; suelen ser líquidos a temperatura ambiente. Son abundantes en la grasa vacuna.

-Ácidos grasos monoinsaturados ( MUFAs). ( un solo doble enlace):

-Ácido oleico,  $\omega$ 9 18:1 (ácido cis-9-octadecenoico).

-Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), ( varios dobles enlaces):

-Ácido linoleico,  $\omega$ 6 18:2 (ácido cis, cis-9,12-octadecadienoico) es un ácido graso esencial, AGE. Abundante en vegetales y aceites de semillas (maíz , girasol,soja...)

-Ácido  $\alpha$  linolénico,  $\omega$ 3 18:3 ( 9,12,15) (ácido cis-9,12,15-octadecatrienoico), es un AGE abundante en los vegetales y en ciertos aceites (por ej. chia).

-Ácido araquidónico (AA),  $\omega$ 6 20:4 ( 5,8,11,14) (ácido cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico) es un AGE abundante en las grasas animales como la carne roja, pero no está presente en los vegetales.

## Eicosanoides

Los PUFAs, de 20 carbonos o más son los precursores de una familia de moléculas llamadas eicosanoides que comprenden las prostaglandinas (PGs), los tromboxanos (TXs), prostacilinas (PGIs) y los leucotrienos (LTs). A las PGs se las designa con las letras PG seguidas de una tercera (de A a I). Esta tercera letra corresponde a distintos tipos de compuestos que difieren entre sí en la posición de las funciones hidroxilo y cetona. Las siglas correspondientes a cada compuesto se completan con un subíndice, indicador del número de dobles ligaduras; PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> por ejemplo.

Las PGs son hidroxiácidos poliinsaturados de 20 átomos de carbono conteniendo un grupo de ácido carboxílico y un anillo de cinco carbonos como parte de su estructura. Se sintetizan en casi todas las células, excepto los glóbulos rojos. Por ejemplo, los tromboxanos (TXs) principalmente en las plaquetas, las prostacilinas en la paredes de los vasos sanguíneos y los leucotrienos, en los leucocitos y en muchos otros tejidos (6).

En general, los derivados de  $\omega$ 3 tienen acción antiinflamatoria, no tanto así los derivados  $\omega$ 6. Prostaglandinas y tromboxanos incluyen anillos saturados y heterocíclicos, mientras que los leucotrienos son lineales.

### Estructura de algunos eicosanoides

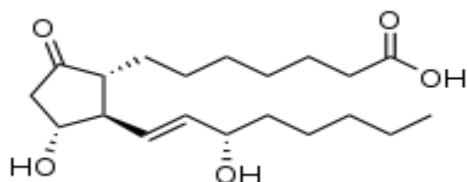


Fig. 2. PG E<sub>1</sub>. El anillo carbonado de 5 lados es característico de su clase y usualmente tienen la forma de una pinza o "invisible" para el cabello.

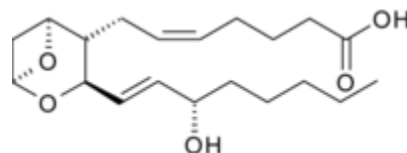


Fig. 3. Tromboxano A<sub>2</sub>. Las moléculas de oxígeno se han incorporado en el anillo.

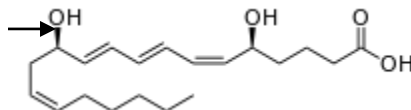


Fig. 4. Leucotrieno B<sub>4</sub>. Note los dobles enlaces conjugados.

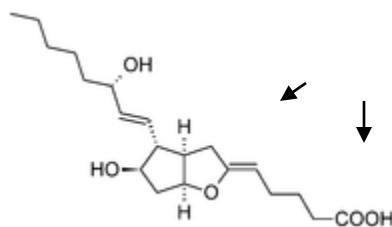


Fig. 5. Prostaciclina  $I_2$ . El segundo anillo lo distingue de las prostaglandinas.

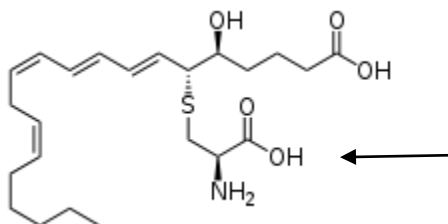


Fig. 6 Leucotrieno  $E_4$ , ejemplo de un leucotrieno "cisteinilo".

Las principales acciones de las PGs se asocian con inhibición de la agregación plaquetaria, aumento de la secreción del mucus en el tubo digestivo, inmunomodulación, contracción del músculo del cuerpo uterino y relajación del del cérvix uterino, broncodilatación. Las prostaglandinas  $G_2$  y ciertos leucotrienos favorecen el proceso de inflamación durante la fase inicial entre sus principales funciones (6).

Los tromboxanos poseen un anillo hexagonal en lugar de pentagonal. Son moléculas heterocíclicas, bien sea de 6 carbonos ó de 5 carbonos con 1 oxígeno, formando éste último un pequeño anillo de oxano.

El ácido linoleico es un AG  $\omega_6$  precursor del AA, con efectos pro-inflamatorios por ej, puede formar directamente la prostaglandina  $G_2$ .

El ácido linolénico es un AG  $\omega_3$  con efectos principalmente antiinflamatorios. Su molécula tiene la última insaturación a tres posiciones del  $CH_3$  final. Es capaz de transformarse en la prostaglandina  $G_3$  (antiinflamatoria). Por la ausencia de las enzimas que sintetizan este AG esencial, los seres humanos tampoco producen ácido  $\alpha$  linolénico y deben obtenerlo de la dieta, por ello es un AGE (7,8).

Una familia de lípidos eicosanoides derivados de los PUFAs, son los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs). Entre ellos los 15-HETE, que contrarrestan la reacción inflamatoria de los leucotrienos. Los 12-HETE, asociados a la agregación plaquetaria, proliferación de células endoteliales (angiogénesis), intervienen en la transmisión sináptica, inducen apoptosis y migración celular y los 8-HETE que participan en la homeostasis lipídica y los procesos inflamatorios (7,8).

## Mecanismo de Acción

Los eicosanoides se unen a receptores proteicos específicos en la membrana de la célula blanco. Pueden ser receptores asociados a proteínas G<sub>s</sub> cuyo mediador es el AMP<sub>c</sub> e inhiben la adenilato ciclasa. O bien, se ligan a receptores asociados a proteínas G<sub>q</sub> y fosfolipasa C, cuya activación eleva los niveles de Ca<sup>++</sup> (6,7).

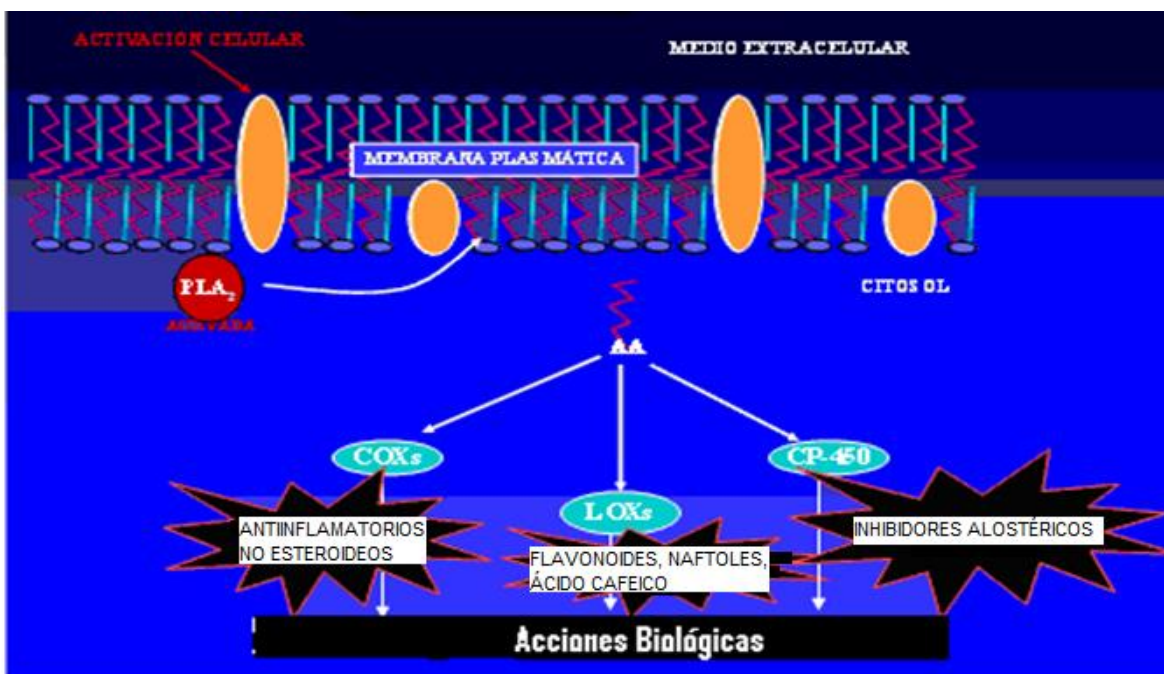


Fig. 7 Esquema de la actividad biológica y formación de los eicosanoides a partir de PUFAs por acción de las fosfolipasas de las membranas biológicas (gentileza de la Prof María Eugenia Pasqualini tomada de una clase teórica).

Debido a sus complejas acciones regulatorias se esquematizan en la tabla 1 las principales acciones fisiológicas de los eicosanoides debido a sus complejas acciones regulatorias

Eicosanoides/acción biológica	Agregación plaquetaria	Vasoconstricción	Vasodilatación	Ca <sup>++</sup> intracelular	Inflamación
TXs	+	+	-	+	+
PGI <sub>2</sub>	-	-	+	-	-
LTs	-	-	+	+	+
HETES	+	+	-	-	-

Tabla 1 Principales acciones de los eicosanoides

### 1.2.5 Las Membranas Celulares, su estructura

Una membrana de 90 Å de espesor, hidrófoba, compartimentaliza el interior y exterior de las células y es clave en la homeostasis celular (Fig. N<sup>o</sup> 9 ) (8,9).

Fosfolípido

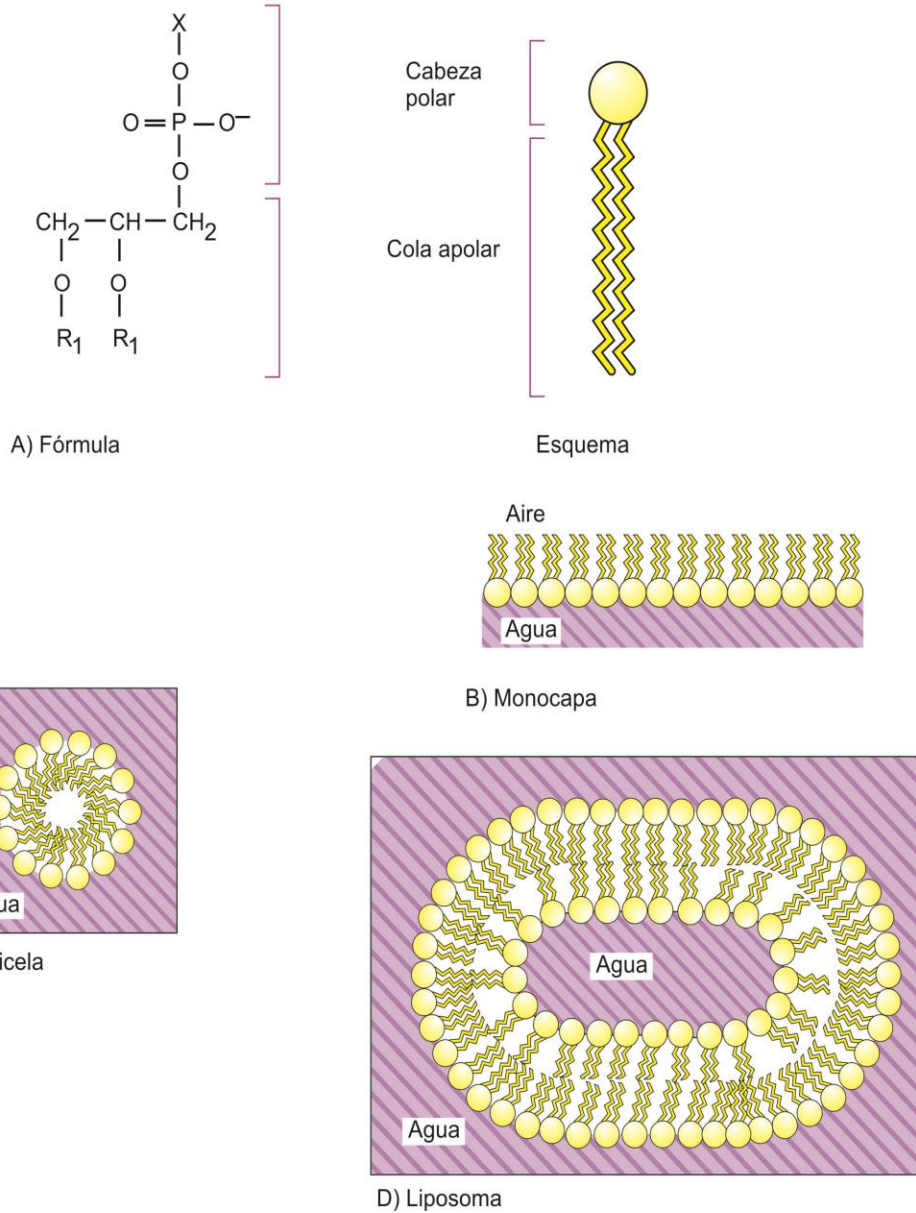


Fig. 9 Ácidos grasos y su tendencia a formar membranas y vesículas en un medio acuoso (Eynard A R, Valentich M.A. y Rovasio R.A. Histología y Embriología del ser Humano. Ed Médica Panamericana, Buenos Aires, 5 Edición ,en prensa 2015).

Las células utilizan tan solo el ~ 5% de sus genes para sintetizar todos estos lípidos, lo que implica que debe haber una ventaja evolutiva en esta complejidad y redundancia (9). Permite interrogarse porqué patologías tan complejas como DBT2, que anteriormente se enmarcaba principalmente en una elevación anormal de la glucemia, ahora se muestra con una complejidad tal que excede un mero aumento de la glucosa.

Hemos mencionado que los lípidos almacenan energía, en forma de ésteres de triglicéridos o formando parte importante de la bicapa de las membranas celulares y actuando como mensajeros en la transducción de señales y procesos de reconocimiento molecular (9). Estos conceptos, que hemos revisado, son la base molecular necesaria para entender el posible uso racional del aporte nutricional supletorio de los PUFAs en la ED.

La insulina tiene un papel clave en la regulación de los procesos celulares, su mecanismo de acción se basa en la interacción con su receptor el cual activa la enzima fosfoinositol 3-quinasa (PI-3-quinasa) que actúa sobre el fosfato inositol difosfato (PIP<sub>2</sub>), hidrolisándolo a inositol-tri3 fosfato (IP<sub>3</sub>) que activa a su vez la proteinkinasa B o AKT (9-12).

### 1.2.6 Acciones biológicas los PUFAs

Los PUFAs, una vez liberados por acción de diversas fosfolipasas, activan una serie de proteínas acopladas a receptores G (GPCRs) como ser, GPR40, GPR41, GPR43, GPR84, y GPR120. Los receptores G tiene como función la transducción de señales. Los ácidos grasos de cadena corta son los agonistas específicos de GPR41 y GPR43, los ácidos grasos de cadena mediana activan el GPR84 y los de cadena larga activan el GPR40. La estimulación de GPR120 por los PUFAs incrementa el flujo de Ca<sup>2+</sup>. La proteína GPR120 se expresa en adipocitos, células de Kupffer y en células L enteroendocrinas del intestino, que producen la incretina, péptido similar al glucagon (GLP-1). La proteína GPR120 funciona como un receptor / sensor en macrófagos y adipocitos maduros. Mediante la interacción con GPR120, los PUFAs DHA y ácido eicosapentaenoico (EPA), median efectos anti-inflamatorios tales como inhibir los receptores Toll-like (TLR), una clase de receptores transmembrana que participan principalmente en las respuestas del sistema inmune innato (29). En la inflamación sistémica de bajo grado (ISBG) se desarrolla insulinoresistencia y las acciones anti-inflamatorias de los PUFAs ω3 se traducen entre otras acciones, a incrementar la sensibilidad a la insulina (8,9).

### 1.2.7 Acción Antiinflamatoria del ácido docohexaenoico ( DHA)

La acción antiinflamatoria del DHA uno de los más importantes metabolitos de la familia  $\omega 3$ , está asociada con la estimulación del receptor GPR120, lo que implica la inhibición del factor de crecimiento transformante  $\beta$ -quinasa activada 1 (TAK1), proporcionando un mecanismo común para la inhibición de las señalizaciones TLR y TNF- $\alpha$ ). Este receptor se expresa en adipocitos maduros, pero no en preadipocitos, ocasionando un aumento de la translocación de GLUT4 a la superficie celular, incrementando en consecuencia el transporte de glucosa. La sensibilización a la insulina por parte de los PUFAS  $\omega 3$  en adipocitos contribuye así al tornar más eficientes las acciones de la insulina. Los músculos no presentan este fenómeno, al no expresar GPR120 (10).

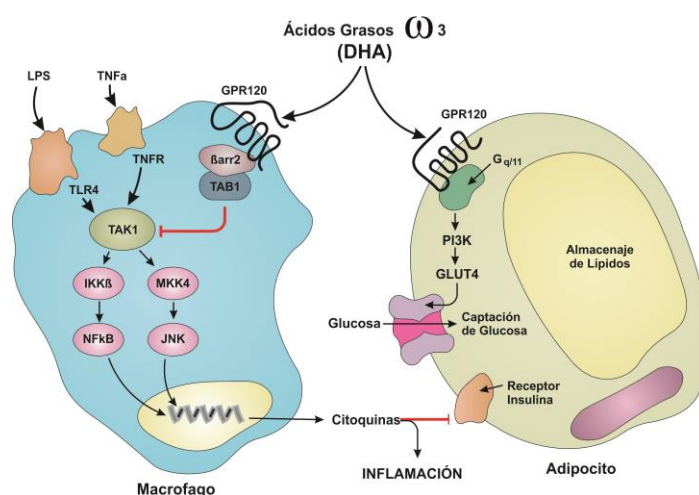


Fig. 8 Esquema del efecto antiinflamatorio ejercido por DHA (10)

El creciente número de resultados de estudios en animales sobre las funciones de los PUFAs  $\omega 3$  en inflamación, sensibilidad a la insulina mediados por la activación de GPR120 indican que ello conforman un punto de control clave en la integración de los anti-inflamatorios y sensibilizadores a insulina (Fig 8). Con la alimentación adecuada, los PUFAs  $\omega 3$  y  $\omega 6$  se incorporan progresiva y equilibradamente a las membranas celulares en todos los tejidos del cuerpo. Así, los cambios en la composición de la dieta tienen efectos profundos en la composición biofísica de las membranas porque los lípidos de la membrana sirven como fuente de precursores para la síntesis de eicosanoides (11), moléculas de señalización celular implicadas en el crecimiento, desarrollo, modulación de la inflamación y en la vía de acción de la insulina (12).

Dado que la homeostasis celular está balanceada por estímulos exógenos y endógenos, el AA y el DHA entre otros AGEs son liberados de las membranas celulares principalmente por la acción de la fosfolipasa  $A_2$  (PLA $_2$ ). En la Figura 8, se observa que el ácido DHA sirve como precursor para la síntesis de eicosanoides biológicamente activos. Tales como: PGs, PGI, TXs y LTs que ,



participan en la activación de plaquetas y leucocitos. Actuando en la elaboración de señales como las del dolor, la broncoconstricción, la regulación de secreciones gástricas. El incremento del consumo alimentario de  $\omega 3$  en relación con  $\omega 6$ , o una reducción en la ingesta de  $\omega 6$ , al equilibrar la relación  $\omega 3/\omega 6$  reduce la capacidad de los monocitos, neutrófilos y eosinófilos para sintetizar mediadores de la inflamación y la capacidad de las plaquetas para liberar tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), un poderoso estimulador del proceso de coagulación (8-12).

Los PUFAs EPA y DHA, sirven como precursores para eicosanoides anti-inflamatorios llamados resolvinas (Rvs) y protectinas (PD). Las Rvs promueven la resolución de la inflamación, siendo la serie D de Rvs derivadas de DHA y la serie E, del EPA respectivamente. Un derivado del DHA de interés, que retomaremos en la Discusión de esta tesis es la protectina D1 (PD1), con intensa acción neuroprotectora. La serie E de Rsv reducen la inflamación, regulan la migración e infiltración de los polimorfonucleares, reducen el número de las células dendríticas y modulan la producción de IL-12, dando así lugar a la resolución de la respuesta inflamatoria y disminuyendo el daño tisular, que inexorablemente acompaña a la inflamación (8,9).

#### 1.2.8 El papel de los PUFAs en el sistema nervioso central (SNC)

Es importante comprender cómo las modificaciones en aporte dietario y en el perfil metabólico de los PUFAs tienen consecuencias en el funcionamiento del SNC. La deficiencia dietaria o metabólica de  $\omega 3$  afecta la transmisión glutamaminérgica en la zona CA1 del hipocampo, que se torna más notable con el envejecimiento (10). Su aporte, en forma de aceite de pescado, que es rico en  $\omega 3$ , disminuye las complicaciones cerebrovasculares como la leucoarariosis, que se observa en la tomografía axial computada como la pérdida difusa de la densidad de la sustancia blanca del cerebro. La leucoarariosis y otras alteraciones de la sustancia blanca frecuentes en la diabetes mellitus tipo 2, se observan próximas a los ventrículos cerebrales y a la corteza cerebral profunda. La misma así como la atrofia cerebral se diagnostica en la clínica mediante imágenes obtenidas por diferentes técnicas, como la resonancia nuclear magnética (RNM) y la tomografía axial computada (TAC) (11).

Desde los estudios pioneros de R.R. Brenner (La Plata, Argentina) de la década del '70, se sabe que en la DBT2 se encuentran alterados el metabolismo de los PUFAs, ya que la conversión de ácido  $\alpha$ -linolénico a ácido octadeca-6,9,12,15-tetraenoico (18:4  $\omega 3$ ) por la acción de la  $\Delta 6$  desaturasa, está disminuida (12,13). El aporte nutricional de AG contribuye a disminuir los efectos de las complicaciones cardiovasculares diabéticas (14) y previene el desarrollo del daño cerebral (15).

### 1.2.9 El papel del ácido docosahexaenoico (DHA) en la función neuronal

El DHA de 22 C y 6 dobles ligaduras es el PUFA más abundante en el plasmalema de las neuronas. Su fuente obligada son los alimentos de la dieta, sea a partir del 18:3  $\omega$ 3(ALA) de los vegetales, o el mismo DHA proveniente de peces y frutos de mar y es imprescindible para la síntesis y homeostasis de la astrogliia. Torna las membranas más fluidas y flexibles, permeables a iones y moléculas pequeñas, crea un ambiente apropiado para proteínas integrales altamente condensadas en neuronas, como diversos microdominios, balsas, receptores, canales iónicos, enzimas y proteínas de membrana (34-36). A su vez, la cantidad de fosfatidilserina en la capa interna de la membrana depende de la disponibilidad de DHA en las neuronas. Es así una molécula que promueve la supervivencia neuronal por translocación /activación de la quinasa Akt y Raf-1/MEK. El DHA facilita también la formación del complejo v-SNARE/t-SNARE necesario para la fusión de las vesículas sinápticas y membranas plasmáticas en el proceso imprescindible para la exocitosis de neurotransmisores. Puede suprimir las respuestas inflamatorias en el tejido nervioso y previene el daño neuronal (16). Una disminución en la concentración cerebral de DHA, como resultado de una dieta relativamente deficiente en  $\omega$ 3 PUFAs o excesiva en  $\omega$ 6, se asocia con disminución de la función cognitiva (17). El DHA tiene efecto neuroprotector al participar en la síntesis de neuroprotectina D1(NPD1). Si se infunde neuroprotectina durante episodios agudos de isquemia-reperfusión cerebral, o se añade a las células durante el estrés oxidativo, ésta inhibe el daño en el ADN frenando el disparo de apoptosis. Asimismo el DHA aumenta la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-2 BclxL, disminuye la expresión de las moléculas pro-apoptóticas Bax y Bad, inhibe el estrés oxidativo inducido por activación de caspasa-3, e inhibe la expresión de IL-1beta, una citoquina intensamente proinflamatoria (18). Así, la deficiencia relativa de DHA tiene consecuencias complejas y progresivamente muy perjudiciales en la función neuronal.

### 1.2.10 Los lípidos y su relación con los mecanismos moleculares normales y alterados de la acción de la insulina

A niveles fisiológicos, la insulina inhibe la producción de glucosa hepática, promueve la captación de glucosa en el músculo esquelético, e inhibe la lipólisis. Su acción inadecuada lleva a deficiencias en la supresión de la producción de glucosa hepática, la eliminación de glucosa en el músculo esquelético y la inhibición de la lipólisis, lo que conduce a hiperglucemia relativa y aumento de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres en plasma (19). Normalmente al aumentar la glucemia, hay una respuesta compensatoria por las células  $\beta$  que secretan más insulina, la cual incrementa la captación de glucosa en músculo esquelético e inhibe la producción de glucosa hepática para mantener la normoglucemia. En la IR la hipersecreción de insulina sostenida en el tiempo conduce a insuficiencia funcional de células  $\beta$ , utilización alterada de glucosa en ayunas, intolerancia a glucosa y finalmente, DBT2 (20).

La insulina ejerce sus acciones fisiológicas al unirse al receptor de insulina (RIns) de las membranas celulares plasmáticas, autofosforilándolo. Luego, se une al dominio homólogo Src de la unidad reguladora de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), lo cual cataliza la transformación del fosfolípido de la membrana plasmática, fosfatidilinositol difosfato (PIP<sub>2</sub>), en el segundo mensajero, inositol 3 fosfato (PI<sub>3</sub>). Este lípido ahora difunde al citoplasma, mientras que el resto de la molécula permanece en la hoja interna de la bicapa lipídica como 1,2 diacilglicerol (DAG) (21,22). El PI<sub>3</sub> activa a continuación la proteína quinasa B (AKT), la cual fosforila la Rab GTPasa e inactiva la proteína AS160. Se reorganiza el citoesqueleto, dando como resultado la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) en la membrana celular, facilitando así la entrada de glucosa en las células. Akt también fosforila y desactiva la glucógeno sintasa quinasa 3, que conduce a la activación de la síntesis de glucógeno, regula la transcripción de varios genes implicados en la gluconeogénesis y la lipogénesis a través del control de factores de transcripción. La señalización defectuosa de la insulina en varios niveles de esta compleja vía de acción, genera finalmente insulinoresistencia (23). Se debe mencionar como factores que también inducen IR al supresor de la señalización de citocinas (SOCS) (24) la fosforilación de la serina de RIns por ácidos grasos libres (25), la activación de NF-kappa B mediada por vías inflamatorias, entre otras (26).

Desde el punto de vista clínico, la adiposidad abdominal que se asocia con niveles plasmáticos de proteína C reactiva elevados (27), el depósito de lípidos en músculo esquelético e hígado están asociados con la patogénesis de la IR (68). Ello se relaciona con la ingesta excesiva de AG que disminuyen la sensibilidad a la insulina y la actividad de la Akt, generándose finalmente IR (28).

### 1.3 Inflamación

#### 1.3.1 Inflamación y Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)

Las ECNT incluyen entre otras patologías, hipertensión arterial, cáncer de todas las variedades, enfermedad respiratoria crónica, diversas demencias y DBT2. Afectan a personas de todas las nacionalidades y clases sociales alcanzando las dos últimas proporciones pandémicas (29). Causan el mayor porcentaje de muerte y discapacidad, representan el 60% de todas las defunciones, el 80% de muertes por patologías crónicas en los países de bajos y medianos ingresos y el 44% de las muertes prematuras (29).

Desde una perspectiva histórica, la inflamación se consideró como la respuesta natural del huésped a un episodio infeccioso agudo y la ISBG una prolongación de la misma que ha adoptado importancia creciente, como una entidad nosológica *per se*, implicada en la fisiopatología de la ECNT (30). La DBT2 está asociada a la ISBG reflejada por los niveles elevados al doble o triple de lo normal de citocinas originadas en el tejido adiposo como TNF- $\alpha$ , que se manifiesta por el incremento de receptores de TNF- $\alpha$  solubles, IL -6. Un marcador del síndrome metabólico y la proteína C-reativa ultrasensible (PCR), entre otros marcadores más

frecuentemente utilizados (31,32). Por ende la ISBG es un blanco de posibles acciones de prevención y terapéuticas, como se ahondará en el presente trabajo, donde se evaluará la presencia de IL-6 en plasma e hipocampo y la presencia de PCR, en plasma, como confiables marcadores inflamatorios de ISBG.

### 1.3.2 Inflamación e Insulinorresistencia (IR)

La IR se define como una respuesta inadecuada de insulina en tejidos sensibles (hígado, músculo esquelético y tejido adiposo) a sus niveles circulantes en los que la ISBG participa en su patogénesis (33). En la IR, la rama innata del sistema inmunitario se activa reclutando macrófagos tisulares (34), liberándose citocinas proinflamatorias originando una inflamación sistémica de bajo grado que interfiere con las vías metabólicas (32,33). En la obesidad, los linfocitos B y sus anticuerpos y los linfocitos T, tales como CD8 + (células T efectoras) desencadenan un proceso inflamatorio (34). Subgrupos de linfocitos T participan en el reconocimiento de estímulos asociados con inflamación y respuesta inflamatoria (30). Linfocitos CD4 + CD25 + Foxp3 + T reguladores (Treg) poseen un papel supresor en las enfermedades inflamatorias y se ha observado que esta variedad de linfocitos protegen a ratones obesos contra la inflamación (35). Simultáneamente se activan otro subconjunto de células inmunocompetentes, con funciones inmunomoduladoras, los linfocitos T asesinos por naturaleza (NKT) (36). A diferencia de las células T, que reconocen péptidos, los NKT reaccionan al estímulo de ciertos lípidos, producen citocinas inmunomoduladoras, proinflamatorias como IFN- $\gamma$  y TNF  $\alpha$ , pero también antiinflamatorias, como IL-4 e IL-10-, interactúan así equilibrando las funciones de múltiples tipos de células del sistema inmune, linfocitos T, B, macrófagos y células dendríticas (DC) (36). Por estas interacciones, los NKT modulan variadas respuestas inflamatorias e influyen en las consecuencias patológicas derivadas (37). Las células NKT se componen a su vez, de subpoblaciones, las células invariantes NKT (iNKT), que expresan un receptor de células T (TCR) (38), que es específico para antígenos lipídicos unidos por la molécula CD1d presentadora de antígeno (38,39). Aunque las iNKT pueden ser activadas directamente por antígenos lipídicos presentados por CD1d exógenos en células presentadoras de antígeno (APCs), estas células también pueden ser activadas por medios indirectos (39). Por ejemplo, una dieta rica en grasa saturada como el exceso de carnes rojas y grasa incrementa el número y actividad de macrófagos y linfocitos CD8 + T en la zona subventricular del encéfalo. Las células iNKT, al producir citoquinas pro y antiinflamatorias, influyen en la respuesta inmune (39), lo cual sugiere que el exceso de lípidos nutricionales del tipo grasas saturadas, es decir los "no-PUFAs" promueve la hiperactividad en células iNKT, aumentando la producción de citoquinas, como TNF- $\alpha$ , que tiene un papel patogénico pro-inflamatorio en la enfermedad metabólica y la perduración de la ICBG (40).

### 1.3.3 Inflamación y Síndrome Metabólico (SM)

El SM se caracteriza, entre otros parámetros alterados, por hiperglucemia, obesidad abdominal, hipertensión arterial, hiperuricemia, alteración de la coagulación, TG elevados en plasma y reducción de los niveles plasmáticos de colesterol HDL (41,42). Las personas con SM presentan perfiles metabólicos proinflamatorios y protrombóticos, riesgo de desarrollar DBT2 y enfermedad cardiovascular. Datos recientes vincularon causalmente la obesidad y aumento de adiposidad con la génesis del SM y DBT2. Esto es ocasionado por conductas nutricionales erróneas; pero también puede lograrse su mejoría, por restricción calórica y el aporte de los ácidos grasos de cadena larga  $\omega$ 3PUFAs, como EPA y DHA, pues estos, son antiinflamatorios (43), reducen los TG plasmáticos y tienen efectos antiobesidad (44). El exceso de TG en adipocitos como resultado del balance positivo crónico de energía, origina sobrepeso y desregulación de los patrones de secreción de adipocinas, asociándose al riesgo de ICBG (45). Los adipocitos (46), las células del estroma vascular, como preadipocitos (47) y los macrófagos (48) son origen de diversas citoquinas proinflamatorias. Por lo tanto la dieta desequilibrada es un factor importante en el desencadenamiento de la inflamación. En los roedores, la vía NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmune-inflamatoria del tejido adiposo visceral, se activa 2 h después de una comida rica en ácidos grasos saturados (AGS) (49). A su vez, la inflamación del tejido adiposo es reducida disminuyendo la ingesta grasa (50). La obesidad se caracteriza por infiltración de los macrófagos del tejido adiposo (MTA) que se clasifican en 2 tipos principales, M1 estimulados por lipopolisacáridos (LPS), que producen citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-6, e IL-1, especies reactivas de oxígeno como óxido nítrico. Los M2 en cambio, son activados por IL-4 e IL-13, expresan factores antiinflamatorios como IL-10. Así, la obesidad induce en las poblaciones de MTA un cambio fenotípico de M2 a M1, ocasionando reducción de IL-10 y aumento de citoquinas pro-inflamatorias, originando un eslabón molecular adicional para el establecimiento de la ICBG (51).

### 1.3.4 Inflamación y Diabetes

La inflamación sistémica de bajo grado (ISBG) es una condición anormal de progresiva relevancia en la clínica, que se define por la elevación crónica y progresiva en fluidos biológicos y los tejidos de marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva ultrasensible y la aparición de valores elevados de diversas citoquinas como IL-6 y ciertos eicosanoides como LTB4 y tromboxano B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) entre otros marcadores. La ISBG se asocia a condiciones subclínicas y clínicas como insulinorresistencia, hipertensión, DBT2, aterosclerosis, enfermedad coronaria, lupus, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer (EA), otras demencias, cáncer e hígado graso no alcohólico (EHNA) (52,53). Estas patologías, otrora aparentemente no relacionadas entre sí, tienen en común entre diversas perturbaciones metabólicas, una alteración en el metabolismo de los AGE. Ello se manifiesta por una producción desequilibrada de eicosanoides proinflamatorios junto con una expresión disminuida del gen de insulina, disminución de la síntesis

y liberación de ciertas lipoxinas antiinflamatorias con intensa acción en el SNC, como son, resolvinas, protectinas y maresinas (52).

El aporte dietario de  $\omega$ 3 representa, al parecer, una posible estrategia preventiva y terapéutica antiinflamatoria, al brindar precursores (macronutrientes) moleculares a través de ciertos alimentos, sustancias antiinflamatorias (54) antioxidantes (55) y neuroprotectina D1 (56), lípidos bioactivos éstos que poseen precisos efectos antiapoptóticos a nivel cerebral (57). En la DBT2 hay disminución del óxido nítrico (NO), incremento del estrés oxidativo y de compuestos proapoptóticos, como las diversas ceramidas, que también son lípidos complejos (58). Estos mecanismos fisiopatológicos perturbados generan una progresiva lipotoxicidad de las células beta del páncreas (59) y cerebro (60). La prevención de esta complicación podría lograrse con un suplemento nutricional con aceite de pescado para demorar, o prevenir, la evolución hacia la DBT2 y la ED concomitante. Cabe señalar que estos macronutrientes han demostrado su inocuidad, dado que forman parte de la alimentación habitual.

### 1.3.5 Los PUFAs, su relación con el síndrome metabólico (SM) y la inflamación

Como vimos en la figura 1 de la página 6, los ácidos grasos derivados del ácido linoleico (LA), pueden ser convertidos en ácido araquidónico (AA) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) origina EPA y DHA. Los últimos se encuentran principalmente en alimentos de origen marino, como peces azules, sardinas, atún, jurel. La relación de PUFAs  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 en la dieta occidental es aproximadamente 10:1 a 20:1. Los países con un consumo de pescado alto, como Japón, tiene una relación de 4 : 1 (61). La alta ingesta de ácidos grasos  $\omega$ 6 afecta la proporción de AA:EPA, lo cual se asocia como hemos visto, con riesgo de enfermedad cardiovascular (12). Se estima que los seres humanos evolucionaron durante el paleolítico ingiriendo una dieta con una proporción de AGE  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 de 1/1, mientras que en las dietas occidentales actuales la proporción es de 15/1, al ser deficientes en AG  $\omega$ 3 y tener cantidades excesivas de AG  $\omega$ 6, lo cual se asociaría con ISBG, incluyendo DBT2, enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades autoinmunes e ISBG (62).

Así, la ingesta de EPA y DHA como tales o su precursor vegetal el ALA, reduce la adiposidad en seres humanos, al combinarlo con restricción calórica (63), aumentando la oxidación de ácidos grasos en hígado, tejido adiposo (64), intestino delgado (65) adipocitos (66) y miocitos (67). EPA y DHA activan la proteína quinasa (AMPK) en el tejido adiposo e inducen biogénesis mitocondrial (37,68). De este modo, desplazan el equilibrio metabólico de los AG hacia la oxidación, en vez de su almacenamiento (41) (Fig.10).

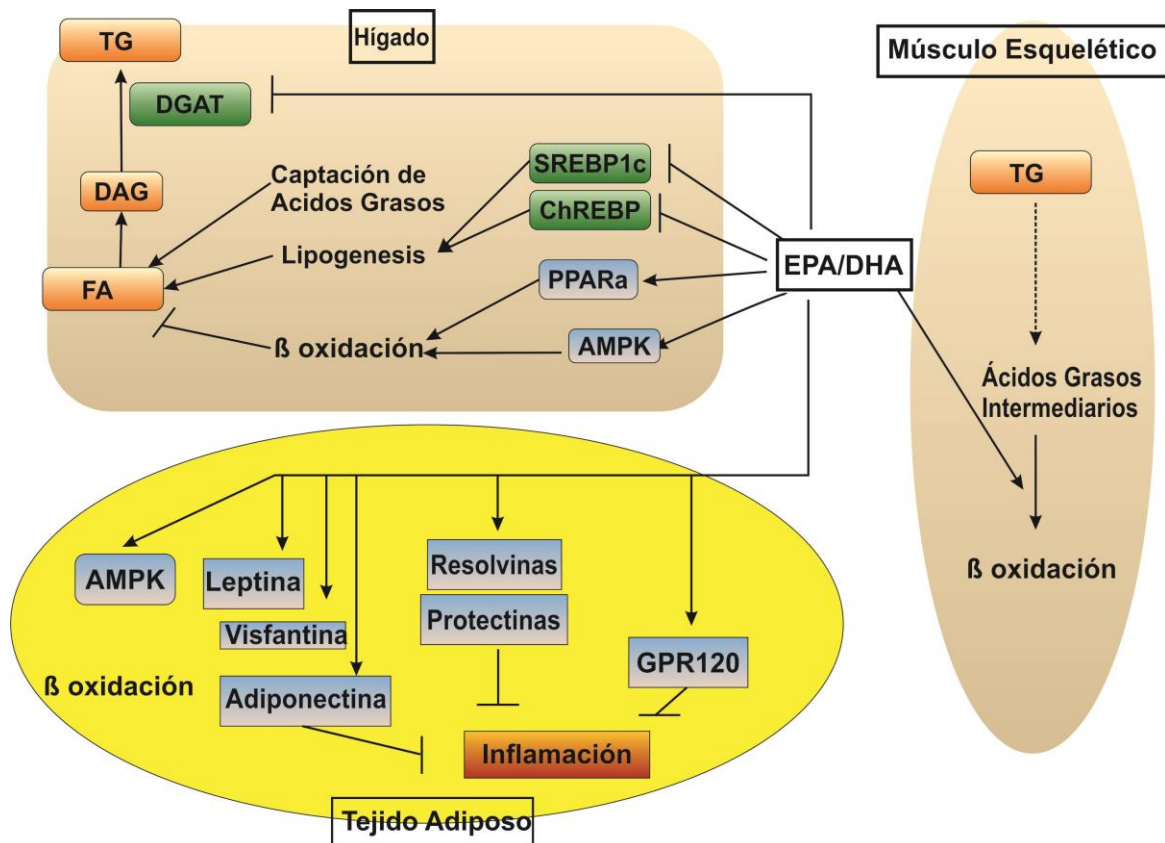


Fig. 10 Efectos integrados en el metabolismo del EPA y DHA en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (41)

EPA y DHA modulan la secreción de adipocinas generadas en el tejido adiposo aumentando sus niveles plasmáticos en seres humanos (69) y roedores (70). Este efecto es dependiente de la activación del receptor activado de los peroxisomas (PPAR) comprobado por el hecho de que no se eleva en respuesta al aceite de pescado rico en DHA y EPA en ratones Knock out de PPAR  $\alpha$  y  $\gamma$  (71). Inducen secreción de leptina y visfantina (citoquina que se expresa en el tejido graso visceral y sus niveles circulantes se correlacionan con la obesidad), reducen la expresión de citocinas proinflamatorias, como TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1 y PAI-1. En síntesis, estas complejas interacciones antiinflamatorias de EPA y DHA dan fundamento molecular a sus efectos sensibilizantes a insulina (29,72). En conclusión los  $\omega$ 3 PUFAS representan una alternativa para prevenir y eventualmente acompañar al tratamiento del SM (Fig.11).

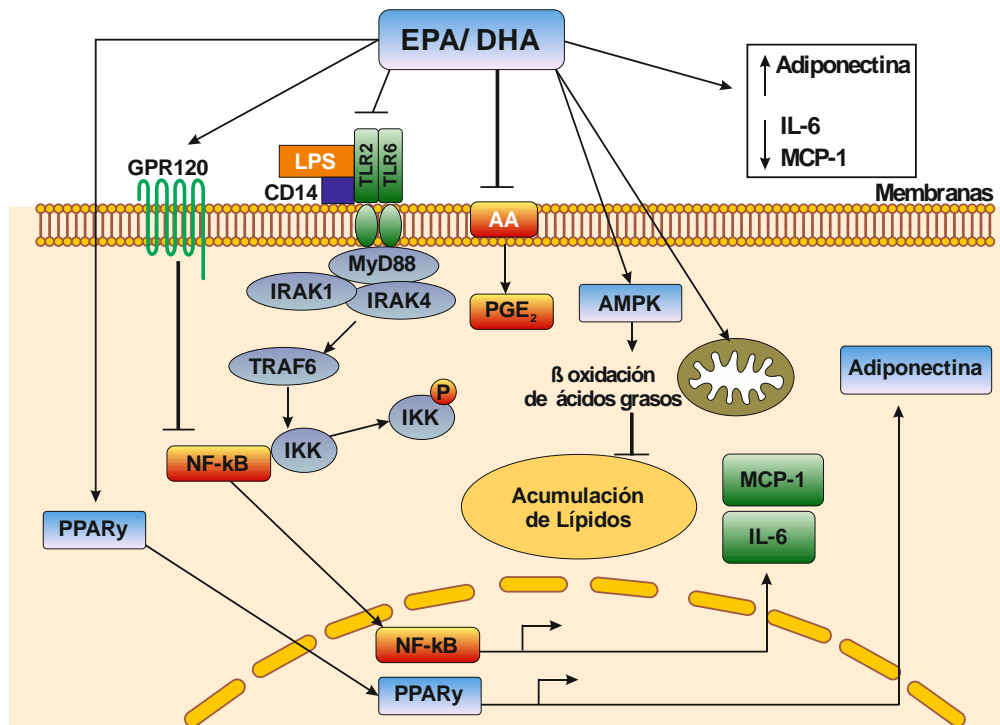


Fig. 11 Mecanismos por lo cual EPA y DHA integrantes de los fosfolípidos de la membrana celular modulan la función del tejido adiposo (41).

## 1.4 Diabetes y Deterioro Cognitivo

### 1.4.1 Hipertrigliceridemia e hiperglucemia y deterioro cognitivo (DC)

El SM es epidémico en occidente y existe una asociación entre obesidad, hipertrigliceridemia, hiperglucemia y deterioro cognitivo (DC) (73). Así, se observó en roedores que un abundante consumo de fructosa origina hipertrigliceridemia, afectando la función cerebral por alteraciones en la membrana de ácidos grasos  $\omega$  3 y  $\omega$  6. Ello altera a su vez su fluidez y la función del receptor de insulina, evitando la activación del fosfatoinositol 2 fosfato, las vías Akt y CREB, provocando un aumento en el índice de resistencia a la insulina y un progresiva disminución en la plasticidad sináptica y cognición (74) (Fig. 12).



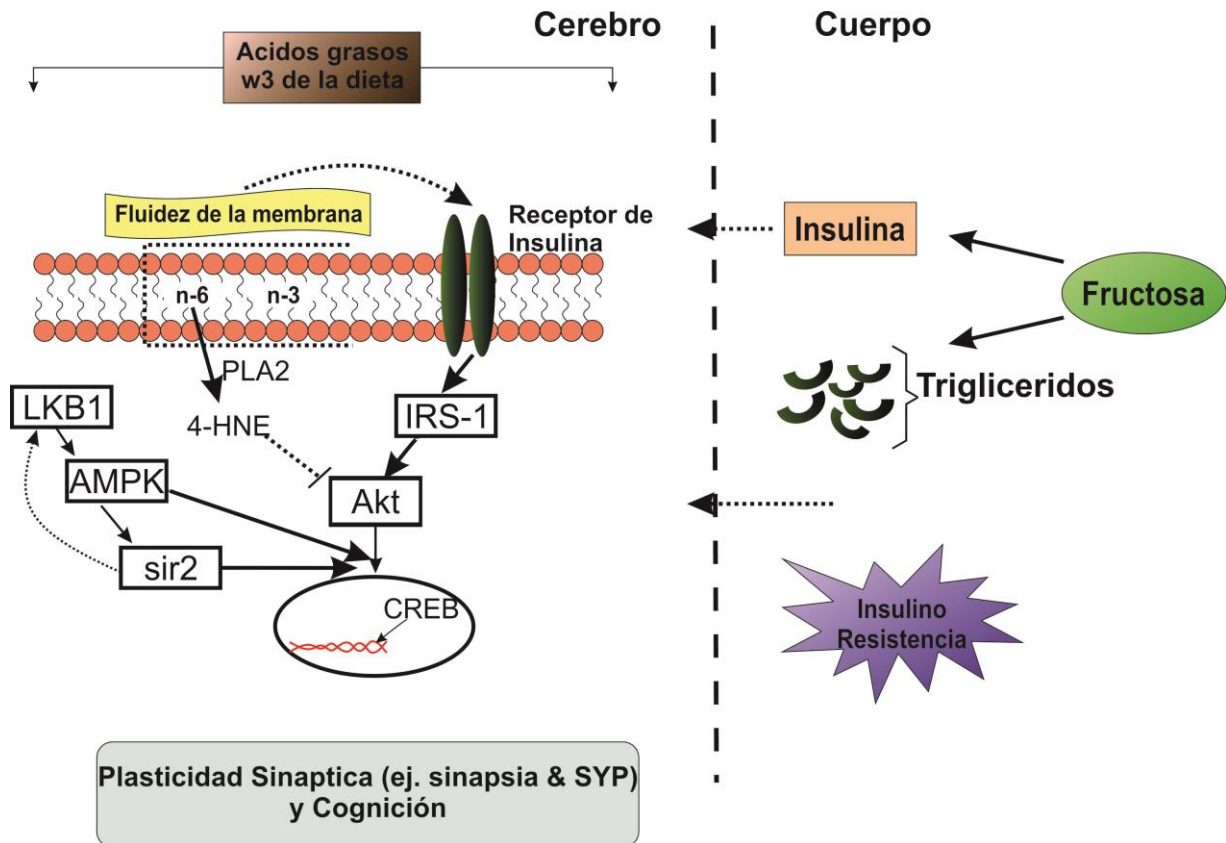


Fig. 12 Mecanismo fisiopatogénico por el cual IR alteraría el metabolismo cerebral (75)

El DC de ratones hipertriglicéridémicos inducidos por la dieta la condición se revirtió al reducirse los TG (75). Un subgrupo deficiente en ácidos grasos  $\omega$ 3 mostraron déficits de memoria, agudizado por la ingesta de fructosa. Se interrumpió así la vía de señalización de insulina en hipocampo, evidenciado por una disminución en la fosforilación del receptor de insulina, ausencia de activación de Akt, mejorando todas estas perturbaciones por el aporte de ácidos grasos  $\omega$ 3 dietarios (75). Así, concluimos que la hipertriglicéridemia constituye un elemento clave en el DC que se observa en la DBT2 de mucho tiempo de evolución.

#### 1.4.2 PUFAs $\omega$ 3 y deterioro cognitivo (DC)

La disminución de la memoria y la desorientación temporo espacial se asocian con disfunción del hipocampo e ISBG crónica, incrementando marcadores como: IL -6, factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , que se redujeron con la ingesta regular de alimentos enriquecidos en  $\omega$ 3PUFAs (76,77). La expresión aumentada de citoquinas es causada por la reactividad glial, de microglia y astrocitos, que contribuyen al DC (78).

El estudio de la relación temporal entre DC y cambios moleculares en la zona CA1 del hipocampo reveló que los procesos inflamatorios crónicos, del tipo de la

ICBG, son responsables del deterioro cognitivo (DC) (79). DHA y EPA, al tener propiedades antiinflamatorias, han sido propuestos como una estrategia terapéutica para tratar la ICBG (80). Se pudo observar en ratones ancianos que la suplementación con aceite de pescado rico en DHA y EPA durante dos meses protege al cerebro de una respuesta inflamatoria y del DC (81). El aceite de pescado tiene esta acción, al modular la excitabilidad de las membranas neuronales, facilitar la plasticidad sináptica y mejorar la generación de ATP mitocondrial en la zona CA1 del hipocampo, hechos todos que podrían proporcionar una conservación de la capacidad de aprendizaje y preservación de la memoria espacial (82).

## 1.5 Apoptosis

### 1.5.1 Apoptosis y Ácidos Grasos Libres (AGL)

El exceso de los AGL está implicado en la reducción de la masa de células  $\beta$ , efecto que se considera lipotóxico (83). La asociación de hiperglucemia e hipertrigliceridemia, denominada "glucolipototoxicidad" frecuente en DBT2, es un factor contribuyente a la apoptosis de las células  $\beta$  con la consiguiente disminución de la masa celular y génesis de diabetes (84). Los AGL tendrían diferentes mecanismos de acción, tales como disminución de la fosforilación de la proteína quinasa B, o AKT o bien "estrés" del retículo endoplásmico (RE) (85). La hiperglucemia potencia el efecto deletéreo de los AGL en el RE (86). La acción oxidativa sobre las membranas del retículo endoplásmico (RE) parece afectar la señalización de insulina a través de la activación del activador del factor de transcripción 3 (ATF3), una proteína de respuesta al estrés metabólico implicada en la supresión de la expresión del gen del substrato del receptor a insulina 2 (IRS2) (87). La elevación crónica de los AGL se asocia con aumento de la apoptosis de las células  $\beta$  en roedores y ello se ha implicado también en la etiología de la pérdida progresiva de la masa de células  $\beta$  que sucede en la DBT2. Asimismo estaría asociado a una inducción temprana de la activación de la vía JNK y FoxO1 (88). Tal asociación entre el incremento de los AGL y apoptosis como mecanismo lesional es un mecanismo que podría explicar, como veremos luego, porque las ratas e-SS de nuestro modelo, desarrollan ED.

### 1.5.2 Apoptosis neuronal y aceite de pescado

El aceite de pescado aporta EPA, DHA, otros ácidos grasos, como MUFA, y otros diversos nutrientes. A partir del DHA se forma neuroprotectina D1 (NPD1) que induce: supervivencia neuronal, mediada por acciones en las proteínas Bcl-2 que intervienen en los pasos pre-mitocondriales de la cascada apoptótica, en la desfosforilación de la proteína S62Bcl-xL que participa controlando la expresión de factores anti- y pro-apoptóticos en respuesta al estrés oxidativo. El aceite de pescado rico en PUFAs  $\omega$ 3 es un regulador de la interacción PP2A/C/Bcl-xL, lo que sugiere una acción estímulo-respuesta específica dependiente de la

fosforilación de Bcl-xL y modula la activación del factor Bcl-2, miembro de la familia antiapoptótica Bcl-2 (89). Estos hallazgos llevaron a la realización de estudios en ratas a las cuales se les había inducido DBT con estreptozotocina. Estos animales presentaron apoptosis neuronal en hipocampo, aumento en la expresión de Bax y caspasa-3 junto con deficiencias en el aprendizaje. El suplemento dietario de aceite de pescado tuvo en ellos un efecto protector a nivel neuronal por efecto anti-apoptótico, mejorando el aprendizaje y memoria (90). Es por ello que fundamentamos en este trabajo ahondar en los efectos del suplemento dietario de EPA, un precursor del DHA en los procesos de ED del modelo experimental.

### 1.6 Sinapsis y aceite de pescado rico en $\omega$ 3

La sinapsis es el sitio de comunicación entre las neuronas y los astrocitos en el cual se intercambia información, se forman diversos circuitos y constituye un elemento clave de la neuroplasticidad (91). En la misma participan diferentes moléculas de unión como integrinas, neuroglinas, proteína de adhesión celular vascular (VCAM) y particularmente, proteínas como la sinaptofisina encargadas de transportar las vesículas sinápticas hasta su exocitosis. La sinaptofisina, también conocida como p38, es un polipéptido glicosilado localizado en la membrana de la vesícula sináptica y juega un papel importante en la regulación de la liberación de neurotransmisores. Su expresión responde a la formación sináptica durante el desarrollo embrionario y aun en la vida adulta, haciendo de esta proteína un marcador para la plasticidad sináptica (92). Es así, una herramienta útil en la investigación del envejecimiento fisiológico y patológico, el trauma o la isquemia del SNC y será utilizada en esta tesis para evaluar el desarrollo de ED y la respuesta a los tratamientos planificados de esta tesis, tal como lo realizaron Wang y col en un modelo de ED utilizando ratas tratadas con estreptozotocina (93).

### 1.7 Los modelos animales utilizados

La rata Wistar procede de una línea albina de la rata parda. Fue desarrollada en el Wistar Institute en 1906 para fines de investigación biomédica y su longevidad en cautividad es de 2-3 años. Presentan valores en plasma y estructura de sus órganos similares a los seres humanos, por lo cual se han constituido en modelos de estudio universales en los centros de investigación biomédicos.

Las ratas son mamíferos omnívoros, presentan una diferenciación morfofuncional entre sus miembros delanteros y traseros, pudiendo manipular objetos como la comida con las patas delanteras o "manos". Son animales curiosos, rasgo relacionado con la capacidad de aprender y la inteligencia, entendida como la capacidad de resolver exitosamente situaciones conflictivas nuevas y poseen excelente memoria. Son capaces de adquirir nuevos conocimientos, tomar decisiones, realizar tareas complejas en pruebas especializadas y en la vida salvaje. Ello las convierte en un modelo adecuado para estudiar las patologías cerebrales en este caso la ED.

Las ratas Stillman Salgado (e-SS) son una línea endogámica de las ratas Wistar desarrolladas en la Universidad de Rosario por el grupo de Tarres y col. en la década del '90. Presentan hipertrigliceridemia precoz, a partir del 5<sup>o</sup> mes, cuando todavía son normoglucémicos. Desarrollan DBT2 de lenta evolución caracterizada por la tolerancia alterada a la glucosa al 6<sup>o</sup> mes, que empeora con la edad. Los machos son más severamente afectados que las hembras. A pesar de su hiperglucemia, los machos eSS tienen un exceso de insulina circulante en los primeros meses de vida lo cual constituye un claro signo de resistencia a la insulina, que disminuye cerca del año de edad. Se han descrito complicaciones crónicas tales como esteatosis hepática. A los 6 meses se observan islotes pancreáticos con disrupción tisular, apoptosis y fibrosis. En riñón desarrollan lesiones similares a la DBT del ser humano de larga evolución sin tratamiento adecuado tales como, glomeruloesclerosis tipo Kimmestiel Wilson, tubuloesclerosis, macroproteinuria e infiltrados intersticiales. Tienen la características de no desarrollar obesidad ni hipertensión arterial (94-97). En estudios preliminares se analizó el cerebro no observándose lesiones compatibles con depósitos de amiloide. Es de destacar que el grupo de Rosario propuso y fue aceptado a este animal como modelo experimental muy útil de DBT2 en la prestigiosa revista *American Journal of Pathology* (95).

La vía intraperitoneal (IP) fue elegida para aportar los AG y el antiinflamatorio y antiapoptótico NDGA y porque permite aportar al animal una cantidad exacta de la sustancia a evaluar sin pérdidas o derrames involuntarios o ser afectada por las sustancias existentes en el tracto alimentario como, enzimas, fibras alimentarias y bacterias entre otras. Esta vía permitió dar una cantidad relativamente pequeña de AG que al no tener efecto calórico permiten estudiar su efecto antiinflamatorio, antiapoptótico y estimulante de la proteína sinaptofisina que participa en la sinapsis. Esta vía fue utilizada exitosamente en un modelo murino de epilepsia por Trépanier y col. para administrar DHA (98) y Prince y col. para evaluar la acción preventiva de los PUFAs  $\omega$ -3 en la esteatosis hepática (99).

## **CAPITULO 2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **2. Hipótesis y Objetivos**

Por todo lo expuesto en las secciones precedentes de la Introducción, la experiencia adquirida en el consultorio de atención geriátrica con un enfoque especial a las personas con diabetes y la necesidad de comprender la ED y obtener datos orientativos hacia una mejor terapéutica y prevención se proponen la siguiente hipótesis y objetivos.

#### **2.1 Hipótesis**

Las ratas e-SS desarrollan al año de edad un cuadro compatible con ED cuyo mecanismo fisiopatológico se asocia a la glucolipototoxicidad, inflamación y estrés oxidativo. La misma podría mejorar ED con el aporte de PUFAS  $\omega$ 3, con o sin el aporte de NDGA.

#### **2.2 Objetivos:**

##### **2.2.1 Objetivo general**

- Establecer si en el modelo experimental, de ratas eSS ,existen signos compatibles con los que se observan en pacientes con ED.
- Evaluar como la administración en forma intraperitoneal de diversos PUFAs y NDGA modifican la aparición y evolución de la DBT2 y los signos de ED en las ratas eSS, comparados con sus controles.
- Consecuentemente, trasladar a la comunidad, un programa de extensión con recomendaciones basadas en los hallazgos realizados en esta Tesis

##### **2.2.2 Objetivos particulares**

- Identificar y caracterizar los signos macroscópicos microscópicos y de laboratorio comparables a ED en las ratas eSS.
- Correlacionar el deterioro de la función pancreática y neurológica con los cambios en el perfil lipídico, estado inflamatorio, estrés oxidativo, apoptosis y edad del animal, en los animales tratados con y sin el aporte exógeno de  $\omega$ 3 y  $\omega$ 6 , con y sin un agente antiinflamatorio natural, el NDGA.

## Capítulo 3 . Materiales y Métodos

### 3.1 Consideraciones Éticas

El proyecto fue aprobado y el trabajo supervisado por el comité de ética local del, Instituto de Biología Celular (Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba) y por las regulaciones internacionales.

### 3.2 Materiales y Equipamiento

#### 3.2.1 Animales

Animales: Se utilizaron en esta tesis, solo ratas machos, un total de 138 animales. 100 ratas eSS, 20 para cada uno de los cinco grupo diabéticos tratados y sin tratar y 38 ratas de la cepa Wistar (control sano). Los animales e-SS fueron de la colonia que a tal fin formó el autor de esta tesis y sus compañeros de laboratorio, en el bioterio del IBC. Las ratas e-SS fueron gentilmente cedidas para su cría y reproducción por la Prof. Dra. M. C. Tarrés de la Universidad Nacional de Rosario al Director, Prof. Dr. Aldo R. Eynard. Los PUFAs fueron inyectados IP a fin de asegurar la dosis al evitar el derrame usual del alimento que hacen los animales cuando comen ,evitar su transformación por biodegradación o adsorción y dar una dosis que no tenga impacto calórico.Todos los animales recibieron la dieta habitual del bioterio(chow) siempre de la misma marca y *ad-libitum*

#### 3.2.2 Equipamiento y Factibilidad

Las instalaciones del Instituto de Biología Celular (Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Córdoba, Argentina) y del Instituto Nacional en Ciencias de la Salud (INICSA), unidad efectora de doble dependencia CONICET y la FCM-UNC cuentan con bioterio, laboratorio de histopatología, equipos de cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida, centrifugas, junto a cámara frigorífica, video microscópios y demás infraestructura estándar, equipos e instrumental menor (sistema para electroforesis, baños termostatzados) y demás material pertinente.

#### 3.2.3 Reactivos

Los reactivos, todos de calidad analítica, fueron obtenidos comercialmente para las determinaciones bioquímicas de los laboratorios Wiener Lab Argentina, anticuerpos de Vector Lab y Cayman Chemicals Lab. El NDGA fue adquirido a Sigma Aldrich. Para la identificación de AG se obtuvieron los ésters metílicos (FAME) y se identificaron por una mezcla de estándares comerciales (Nu-check, EE.UU.).Las determinaciones se realizaron según técnicas de rutina en nuestro laboratorio (100-102). Parte de los reactivos fueron gentilmente cedidos por el Prof. Undurti N. Das, Presidente y director de investigación de la compañía de biotecnología privada Ciencias LLC, Massachusetts, EE.UU., y Profesor de

Investigación de Cirugía y Nutrición en SUNY (Universidad Estatal de Nueva York) Upstate Medical University, Syracuse, EE.UU. que forma parte de este proyecto y también por el aporte de la Fundación Grupo de Amigos de los Diabéticos (Personería Jurídica 231), Córdoba Argentina y la Fundación de la FCM-UNC la cual brindó aportes para el mantenimiento de la colonia de animales .

### 3.2.4 Diseño experimental

#### Protocolo de trabajo

Los PUFAs fueron inyectados intraperitonealmente (IP) Para evitar los sesgos, los controles fueron inyectados con solución salina isotónica por la misma vía y con idéntica frecuencia y número total de inyecciones que las ratas tratadas.

Según muestra la Fig 13, se administraron los PUFAs mensualmente a los diferentes grupos desde el día 40 hasta cumplir los 12 meses, de la siguiente manera: 1) Grupo Control e-SS (control diabético): solo solución salina isotónica; 2)  $\omega$ 6 (e-SS): solución isotónica con 2,5 mg de AA al 90% (AA) . 3)  $\omega$ 6 + NDGA (e-SS): solución isotónica con 2,5 mg de AA al 90% + 0,75 mg de NDGA. 4)  $\omega$ 3 (e-SS): solución isotónica con 2,5 mg de aceite de pescado conteniendo 35% de ácido eicosapentaenoico (EPA) y 40% de ácido docosahexanoico (DHA). 5)  $\omega$ 3 + NDGA (e-SS): solución isotónica con 2,5 mg de aceite de pescado + 0,75 mg NDGA. 6) Wistar " control no diabético " : sólo solución salina isotónica .

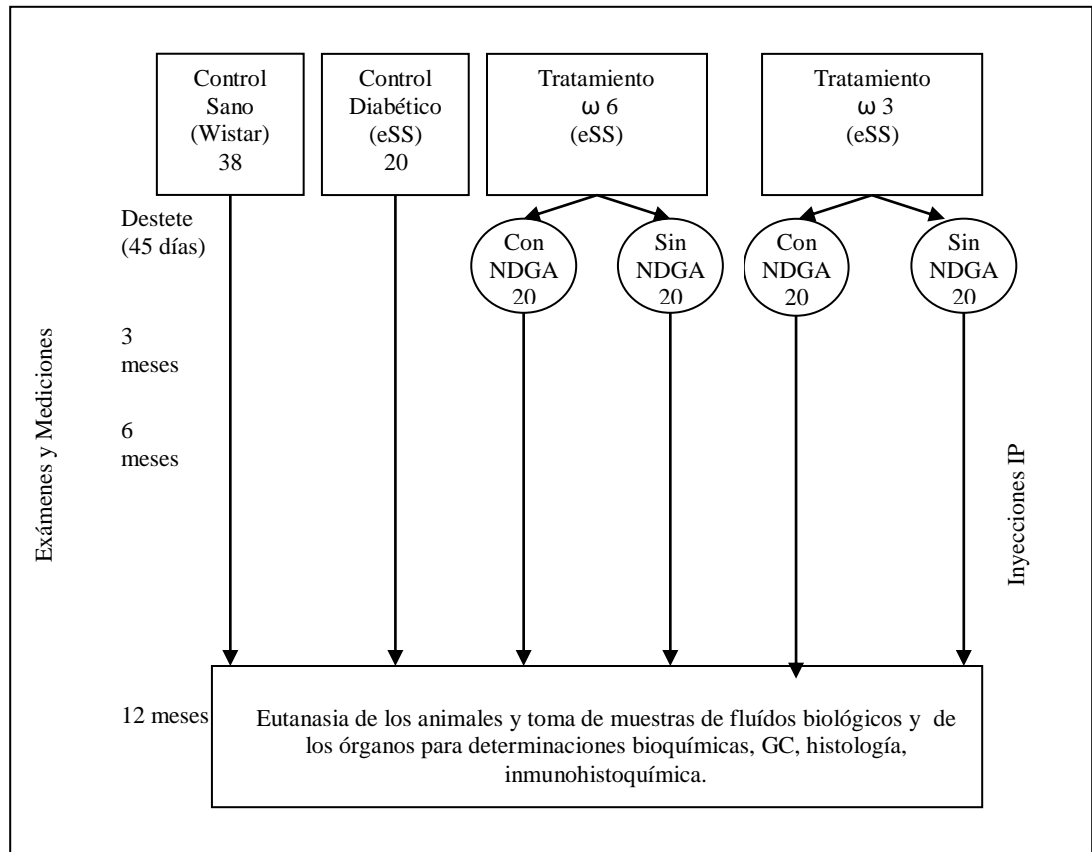


Fig. 13 Diseño experimental

### 3.3 Estudios realizados

#### 3.3.1. **Marcadores Clínicos:**

3.3.1.1 -Peso,

3.3.1.2 -Sobrevida,

#### 3.3.1.3 **Estudio de la Conducta animal:**

-Test Neurocognitivo "*Hole Board Test*"-Prueba del Hueco (103)

#### 3.3.2 **Estudio Diagnóstico por imágenes.**

-Tomografía Axial Computada de cerebro (TAC)

#### 3.3.3 **Determinaciones Bioquímicas**

3.3.3.1 Obtención de la muestra

3.3.3.2 Parámetros relacionados con la Glucemia:

3.3.3.3 Glucemia en ayunas

3.3.3.3 Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG)

3.3.3.4 Hemoglobina glucosilada (HbA1c),

3.3.3.5 Estudio de los lípidos

3.3.3.5.1 Colesterol (Col),

3.3.3.5.2 Triglicéridos (TG),

3.3.3.5.3 Perfil de ácidos grasos plasmáticos por cromatografía de gases.

#### 3.3.4 **Marcadores de estrés oxidativo:**

3.3.4.1 y 3.3.4.2 Gamma glutamil transpeptidasa (GGT) en plasma y cerebro

3.3.4.3 Hidroperóxidos

3.3.4.4 Lipoperóxidos

#### 3.3.5 **Marcadores de inflamación:**

3.3.5.1 Proteína C reactiva (PCR) ultrasensible

3.3.5.2 Inteleucina-6 (IL-6) en plasma e hipocampo

#### 3.3.6 **Estudio de la apoptosis .**

3.3.6.1 Citometría de flujo para determinar apoptosis en hipocampo

3.3.6.2 Técnica de TUNEL en Hipocampo

### 3.4 **Estudios morfológicos y morfométricos**

3.4.1 Técnica de HE

3.4.2 Técnica de Nissl

3.4.3 Inmunohistoquímica

### 3.5 **Estadística**

### 3.1 **Marcadores clínicos**

Los animales se controlaron clínicamente dos veces por semana guiándose por una tabla de cotejo durante la inspección, en la cual se observó características corporales como el color del pelo, aparición de alopecia, presencia de escamas pútridas, simetría de las partes corporales, presencia de cifosis u otra postura anómala... Se examinó la marcha y la presencia de disbasia al movilizarse, movimientos anómalos, respuesta ante los estímulos de llamado y del tacto. Se observó si los animales se alimentaban correctamente, las características de la orina color y olor, características de la materia fecal, color, forma y consistencia. A la palpación torácica se evaluó que los movimientos respiratorios fueran armónicos y regulares descartándose la presencia de rales o de otra patología



respiratoria. A la palpación cardíaca se observó si la frecuencia y regularidad de los latidos eran normales. Se palpó toda la superficie corporal en busca de posibles formaciones tumorales.

### 3.1.1 Peso Corporal

Los animales fueron pesados cada 15 días bajo condiciones estándares.

### 3.1.2 Sobrevida Animal

Los animales que no se sacrificaran a los doce meses en un número de 1) Grupo Control e-SS (control diabético): 8; 2)  $\omega$ 6 (e-SS): 8. 3)  $\omega$ 6 + NDGA (e-SS): 9. 4)  $\omega$ 3 (e-SS): 9. 5)  $\omega$ 3 + NDGA (e-SS):9. 6) Wistar "control sano" :10, fueron seguidos durante treinta y cinco meses y/o hasta su muerte espontánea. En estos se controló: el peso, su comportamiento, movilidad, pelaje, respiración y alimentación cada 15 días.

### 3.1.2 **Estudio de la conducta animal**

Prueba de "*Hole Board Test*" o Prueba del Hueco

En 16 animales de cada grupo se realizaron las pruebas de comportamiento cognitivo, a los 6 y 12 meses de edad. Las pruebas se llevaron a cabo bajo la luz del día entre las 09:00-15:00 hs después de ayunar, a partir de las 19:00 en adelante. La caja se mantuvo en la misma posición y temperatura, en cada ocasión. La dimensión de la caja es de 50 x 50 cm, con paredes blancas, un piso separado dos centímetros de la base, con cuatro agujeros iguales de 2,5 cm de diámetro cada uno, colocados en dos líneas equidistantes entre sí y de las paredes (Fig.14).

Con esta caja, los patrones de comportamiento que se pueden estudiar en términos generales pueden denominarse "**exploración**", en términos de motivación, neofilia y neofobia. Neofilia puede definirse como la atracción que muestran las ratas hacia un objeto o lugar extraño, simplemente porque es novedad. Neofobia es la aversión que el animal muestra al acercarse a un objeto o lugar nuevo (104).

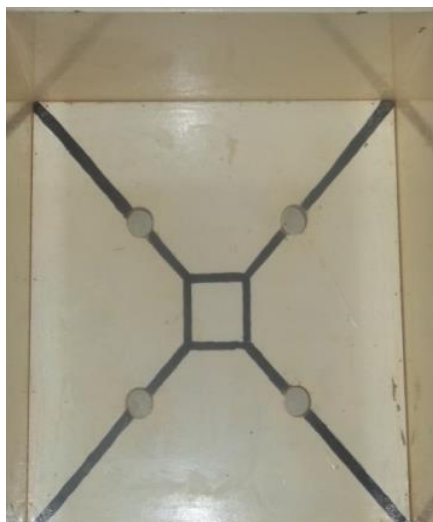


Fig. 14 Caja para el Estudio de la conducta animal Prueba de "*Hole Board Test*" o Prueba del Hueco

Cada rata se posicionó en el centro de la caja. Durante 10 min, se siguieron los siguientes criterios de estudio del comportamiento, por el mismo observador. (I) "Movimiento": tiempo durante el cual el animal deambula (Fig. 15); (II) "*Head-Deep*" (inmersión de la cabeza): el animal introduce su cabeza en uno de los agujeros, a una profundidad mínima tal que las orejas se posicionan en el mismo nivel con respecto al suelo de la caja (Fig. 16); (III) "*Rear*" (alzarse en dos patas): el animal se para sobre sus patas traseras y levanta sus patas delanteras del suelo, extendiendo su cuerpo verticalmente, posición en bipedestación que puede mantener varios segundos (Fig 17) (105).



Fig. 15 Estudio del Comportamiento "*Hole Board Test* " o Prueba del Hueco  
Movimiento: se observa durante cuanto tiempo el animal se desplaza durante los 10 minutos en cada exámen.

"*Head-Deep*", está relacionada con el procesamiento de la información (106), el comportamiento exploratorio y la neofilia (105) ."Movimiento" se asocia con un sistema intacto sensitivo y motor y está relacionado con el procesamiento de los estímulos de motivación-conductuales y procesos de plasticidad funcionales. Tiene un asiento anatómico en el extremo del giro dentado del hipocampo (107).



Fig. 16 Estudio del Comportamiento "*Hole Board Test* " o Prueba del Hueco "*Head-Deep*": se observa cuantas veces el animal introduce la cabeza en uno de los cuatro agujeros de la caja, durante los 10 minutos en cada exámen.

"*Rear*" es un marcador útil de neofilia, pues se asocia con la actividad eléctrica del hipocampo, es un componente crucial de la orientación visuoespacial asociado con el aprendizaje visuoespacial , el equilibrio y la memoria (108).



Fig. 17 Estudio del Comportamiento "*Hole Board Test* " o Prueba del Hueco "*Rear*": se observa cuantas veces el animal se para en sus patas traseras durante los 10 minutos de cada exámen.

### 3.2 Estudio de Diagnóstico por Imágen

#### Tomografía Axial Computada de Cerebro (TAC)

A los doce meses, se efectuó una TAC de cerebro a cuatro animales de cada grupo estudiado. Para la realización del estudio fueron anestesiados con isoflurano. Se utilizó un equipo de tomografía helicoidal de giro continuo (Picker<sup>R</sup>) en el Instituto Di Rienzo de Diagnóstico por Imágenes de Villa Carlos Paz, gracias a la gentileza del Dr Luis Alberto Rulli . Para evaluar el cerebro de los animales y por peculiaridades del pequeño tamaño del cerebro murino, el equipo utilizado debió adaptarse al análisis de las imágenes de esta especie.

Así se estudiaron las diferentes tonalidades de la escala de grises y basándose en la práctica realizada y estandarizada en pacientes se estableció una escala diseñada de 1 a 5, la cual se denominó "homogeneidad tisular", donde 1 se asoció con la uniformidad del color gris perteneciente al grupo "Wistar" (control no diabético) tomado como referencia y 5 a la presencia de "islas" de color negro como la máxima expresión de daño tisular (Fig. 18). Estas diferencias fueron establecidas con la ayuda del software GraphPad Prism 5.

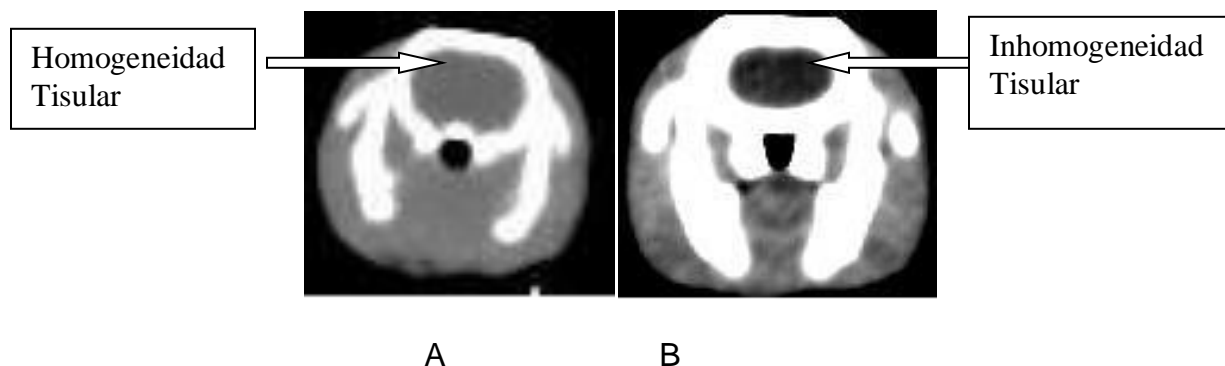


Fig. 18 Imágenes de TAC de cerebro murino A: rata "Wistar"(control sano), B: rata e-SS Control (sin tratamiento)

### 3.3 Determinaciones Bioquímicas:

#### 3.3.1 Obtención de las muestras

1.- En la determinación de la glucemia en sangre capilar se punzó el extremo distal de la cola con un digitopunzor y se obtuvo una gota de sangre.



Fig. 19 Obtención de las muestras Etapa de preparación

2.- También se obtuvieron muestra hemáticas, al final de cada período establecido con el objetivo de obtener plasma o sangre entera, a fin de realizar determinaciones bioquímicas, en las cuales el animal fue anestesiado con isoflurano. Luego se sometió a hipertermia Fig. 20 al extremo distal de la cola para provocar vasodilatación mediante la introducción de la misma en agua caliente a 40°C. Luego, se realizó una sección del extremo distal y se colectó aproximadamente 0.5-1ml de sangre por animal en tubo de vidrio, con el agregado de anticoagulante como citrato de sodio 70% (Fig. 21).



Fig. 20 Vasodilatación de la cola por medio del calor para facilitar la extracción de sangre



Fig. 21 Recolección de la sangre

La sangre, inmediatamente extraída fue centrifugada a 1.500 G por diez minutos obteniéndose el plasma que se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A los doce meses de edad seis animales de cada grupo fueron anestesiados con isoflurane y se obtuvo sangre para las determinaciones bioquímicas hasta su exanguinación, la cual fue separada en sangre entera para la determinación de HbA1c y plasma, para los demás análisis. Luego se procedió a la autopsia sistemática así como para la extracción de los diversos órganos y tejidos para su evaluación histopatológica.

### 3.3.2 Parámetros relacionados con la glucemia

#### 3.3.2.1 Glucemia en ayunas

Los animales estuvieron en ayunas diez horas previas a la medición de la glucemia. Se obtuvo la sangre por punción de la cola y se midió en sangre total con un equipo "Accucheck Performa"® del laboratorio Roche Diagnostics.

### 3.3.2.2 Prueba de Tolerancia oral a la Glucosa (PTOG)

Los animales estuvieron en ayunas diez horas previas a la medición de la glucemia. Se obtuvo la sangre por punción de la cola y se midió en sangre total con un equipo "Accucheck Performa" ® del laboratorio Roche Diagnostics. Luego de una administración de una carga de dos gramos de glucosa /Kg de peso por sonda nasogástrica, se controló la glucemia a la hora ( la cual no se considerará a los fines de estudios estadísticos en el presente trabajo ) y a las dos horas. Se consideró que los animales eran diabéticos cuando se midió una cifra de 125 o más mg/dl en ayunas en dos oportunidades y 200 mg/dl a las dos horas del aporte de glucosa.

### 3.3.2.3 Hemoglobina glicosilada HbA1c

La Hemoglobina glicosilada se midió en sangre total mediante la técnica estándar de turbidimetría. Se consideró un punto de corte como valor anómalo a 6.5 mg/dl o superiores.

### 3.3.3 Parámetros relacionados con el metabolismo lipídico

#### 3.3.3.1 y 3.3.3.2 Estudio del Colesterol Total y Triglicéridos

Se determinaron los valores de colesterol total y triglicéridos, mediante pruebas fotocolorimétricas con kits del laboratorio Wiener®.

#### 3.3.3.3 Estudio de los Ácidos Grasos por Cromatografía (GC)

Los lípidos de las muestras de plasma se obtuvieron por el método de Folch y fueron metilado con metóxido de sodio. La separación, cuantificación y la identificación de los esteres metílicos (FAME) resultantes se realizó utilizando una columna capilar (20 m de longitud BPX, 0,25 mm ID, película de 0,25 micras, SUPELCO ©, EE.UU.) en un cromatógrafo de gases © (Perkin-Elmer) Clarus 500 (16,28,32).

### 3.3.4 **Parámetros relacionados con la inflamación**

#### 3.3.4.1 Proteína C Reactiva Ultrasensible (PCR)

A los 12 meses en diez animales de cada grupo de estudio, se midió en suero la proteína C reactiva Ultrasensible (PCR) mediante el turbitest. Este estudio es de rutina en la práctica clínica lo cual facilita la transferencia de los conocimiento obtenidos en la experimentación animal a los seres humanos.

#### 3.3.4.2 Medición de Interleucina 6 (IL-6) en plasma e hipocampo

La IL-6 en plasma fue cuantificada con el kit Human IL-6 ELISA kit II (LabBDLab®) según el protocolo del laboratorio.



El estudio de la IL-6 en hipocampo fue realizado gentilmente en el laboratorio de la Fundación Para la Salud por el Prof Dr Gerardo Gatti, quien determinó la expresión de ARNm de IL6 por PCR en tiempo real en tejido de hipocampo en cuatro animales de cada grupo. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

Obtención de células del hipocampo: se disecó la zona del SNC a estudiar (111) y se cortaron en pequeñas piezas (1-2 mm<sup>3</sup>), sumergiéndolas en 300ul de tripsina de 0,25% y se incubaron a 37°C por 30 min. Las suspensiones celulares resultantes se filtraron sucesivamente a través de filtros celulares de 70 y 40 µm de poro. Las células se resuspendieron en PBS, y posteriormente se evaluó su viabilidad utilizando el colorante supravital azul de tripano y simultáneamente se determinó el número de células en cada suspensión celular.

El ARN total se extrajo a partir de las suspensiones celulares obtenidas de hipocampo (punto 1.1), con TRIzol® y se cuantificó utilizando un método fluorométrico (The Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies). La reacción de transcripción reversa se realizó partiendo de 2 µg del ARN total. En una primera etapa la muestra se incubó con 2U de DNAsa (Life Technologies) por 15 min a temperatura ambiente. Luego, se detuvo la reacción con 1µl de EDTA 25mM (Life Technologies) y se incubó por 10 min a 65°C. Posteriormente las muestras se incubaron 1 hora a 42°C con 0,5 µg de oligo (dT) (Promega), 25 U del inhibidor de ribonucleasas (RNasin) (Promega), 1 mM deoxinucleótidos trifosfatos (Life Technologies) y 200 U M-MLV de transcriptasa reversa en el buffer de reacción MMLV 5X (Promega). Las muestras de copias de ADN se amplificaron utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) utilizando oligonucleótidos específicos (Life Technologies). Las muestras de ADNc se amplificaron por triplicado con un StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para cada muestra, la abundancia de ARNm se normalizó con respecto a la cantidad de ARNm de β-actina (utilizado como gen de referencia).

La secuencia de oligonucleótidos para este ensayo es: IL6\_Fw TAGTCCTTCCCTACCCCAACTTCC, IL6\_Rev TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC; β-actina\_Fw CCGCATCCTCTTCCTCCCT, β-actina\_Rev GCCACAGGATTCCATACCCAG.

### **3.3.5 Parámetros relacionados con estrés oxidativo**

#### **3.3.5.1 Estudio de la Actividad de la Enzima Gamma Glutamyl Transpeptidasa en Plasma y Cerebro**

Los niveles plasmáticos y de tejido cerebral de la actividad de la enzima gamma glutamil transpeptidasa (GGT), una enzima clave en el metabolismo antioxidante, se midieron en seis animales de cada grupo al 12<sup>o</sup> mes por un método colorimétrico (Weiner Lab ®) (110).

#### **3.3.5.2 Estudio de los niveles de Lipo e Hidroperóxidos en plasma**

También se estudiaron hidro y lipoperóxidos en plasma mediante la técnica de xilenol- orange, en seis animales de cada grupo, al 12<sup>o</sup> mes (102,110).

Enzimas hepáticas: las transaminasas, oxalacética-pirúvico y oxalacética glutámico decarboxilasa se determinaron en plasma por el método colorimétrico (Weiner Lab ®). Estos procedimientos se realizaron junto con las determinaciones de GGT para descartar que los valores de la misma estuviesen asociados a daño compatible con estrés oxidativo y no a daño hepático.

### **3.3.6 Parámetros relacionados con la apoptosis**

#### **3.3.6.1 Citometría de Flujo**

Se estudió la apoptosis en ratas de 12 meses, en células del hipocampo en cuatro animales de cada grupo. Para ello se obtuvo la muestra del hipocampo. Se empleó el Kit ANNEXIN V: PE APOPTOSIS DETECTION KIT I (BD Bioscience®) según el protocolo comercial del laboratorio.

#### **3.3.6.2 Estudio de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL**

Mediante la detección de la desoxinucleotidil terminaltransferasa (TdT) por inmunoperoxidasa (114). Para lo cual se utilizó el kit de ApopTag® Peroxidase se estudiaron diez animales de cada grupo.

### **3.3.7 Estudios Morfológicos y Morfométricos**

#### **3.3.7.1 y 3.3.7.2 Estudio de microscopía óptica en el examen histopatológico del cerebro**

Para analizar las alteraciones generales del cerebro se realizaron las técnicas de H-E y Nissl (Fig 22).

Las muestras de tejido fueron fijadas en formol al 10% neutralizado con acetato de calcio. El cerebro una vez extraído se deshidrató e incluyó en parafina. Se utilizaron múltiples cortes en el plano coronal ~ 1,5 mm detrás del Bregma con un micrótopo a 5 µm de cada muestra, los que posteriormente se colorearon con hematoxilina y eosina y con la Técnica de Nissl (violeta de cresilo al 0,1% durante dos minutos según técnica de rutina del laboratorio) (115). Las secciones fueron evaluados utilizando fotomicrografías obtenidas en un microscopio de luz Leika a 40x. Las imágenes se analizaron con el programa Axion Vision.

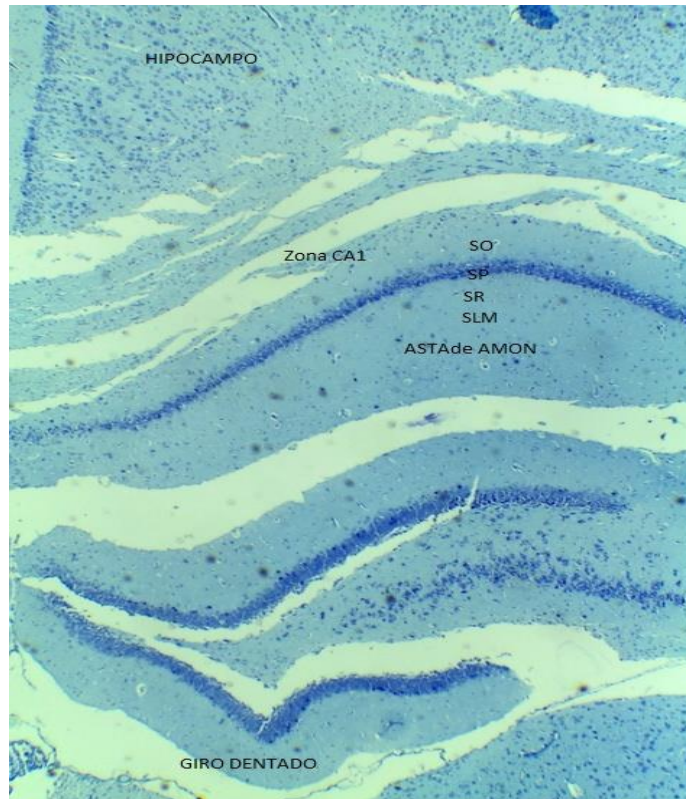


Fig. 22 Hipocampo. Nissl 10 x . Giro dentado y el Asta de Amón. Se puede identificar la zona CA1 y los estratos oriens (SO), piramidal (SP),reticular (SR) y lacunosomolecular (LM).

En la zona CA1 del Asta de Amón (110-113) y en el Giro Dentado se estudiaron las características morfológicas y la organización estructural de las neuronas con técnicas de H-E y Nissl (115) en campos seleccionados con el método de la cuadrícula de 10 x y 40x. Se denominó " neurodegeneración " a los cambios morfológicos anómalos de las células, en el núcleo y en el citoplasma, estableciéndose una escala diseñada de 1 a 10 en base a la acidofilia o basofilia del citoplasma, al estado de la cromatina nuclear, su morfología y disposición en estratos. Donde 1 corresponde a células con citoplasma basófilo de forma regular, núcleo esférico con cromatina laxa y nucleolo prominente. En tanto, el otro extremo corresponde a 10, células acidófilas con núcleo de forma irregular picnótico sin nucleolo visible, la presencia eosinofilia en el citoplasma, células "achicharradas" (o *shrunken*), e intensa vacuolización citoplasmática con disminución del espesor de la capa y dispersión de la misma (116,117) (Fig 23).

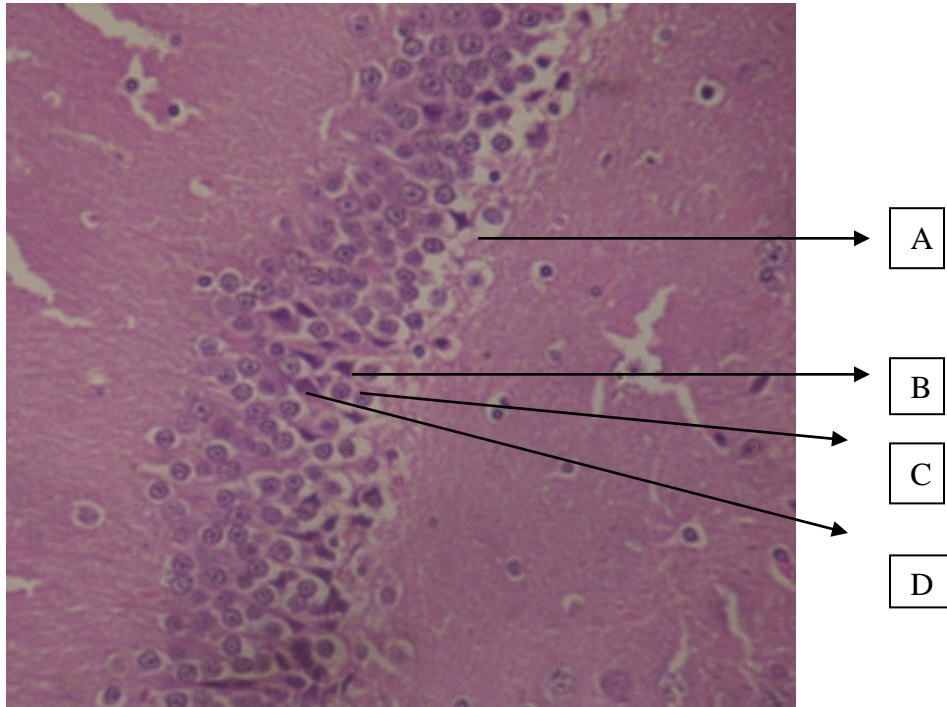


Fig. 23 Giro Dentado del Hipocampo. H-E 40 x. Rata e-SS Control H-E 40 x  
 A) célula picnótica. B) célula "naranja". C) célula ganglionar "normal".  
 D) Célula piramidal "normal".

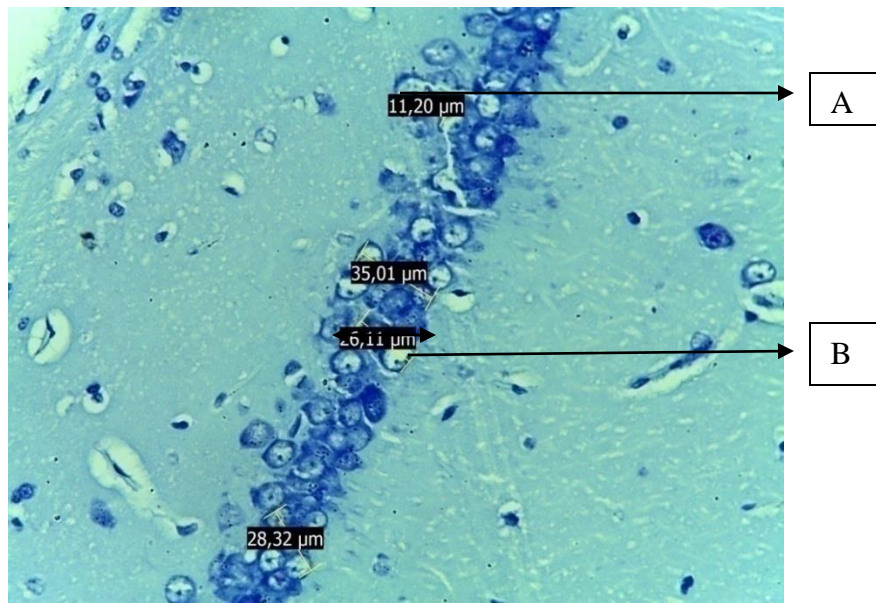


Fig. 24 Capa piramidal de la zona CA1 del Asta de Amón del Hipocampo Nissl 40x. Rata Wistar (control no diabético) . A) Dispersión, núcleo de célula ganglionar en el límite de la capa piramidal .B) Espesor.

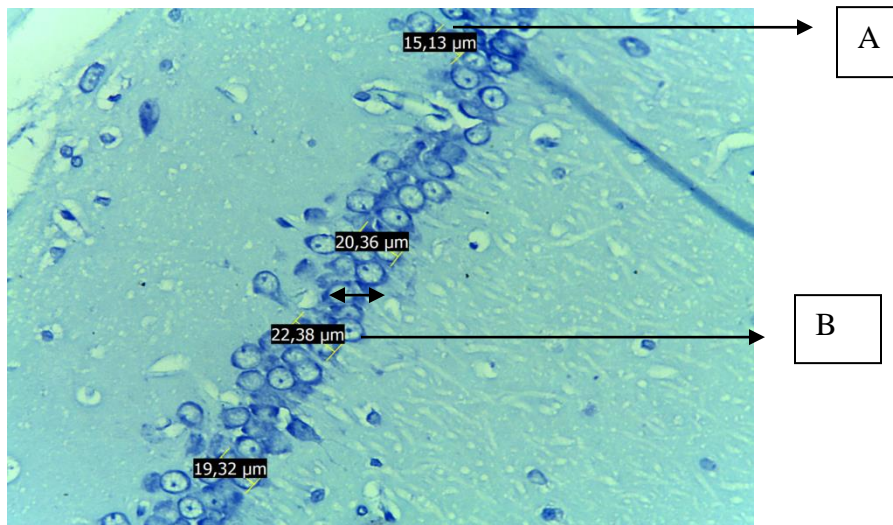


Fig. 25 Capa piramidal de la zona CA1 del Asta de Amón del Hipocampo Nissl 40x. Rata e-SS Control (control diabética). En esta microfotografía se observa la dispersión y disminución del espesor de la capa piramidal del hipocampo en las ratas diabéticas. Comparada con los animales Wistar (no diabéticos) (Fig.24) se puede observar la diferencia entre estos grupos.

- A) Dispersión, núcleo de célula ganglionar en el límite de la capa piramidal.
- B) Espesor.

Con la técnica de Nissl se analizó la organización "estructural" en el cual se estudio el espesor del estrato piramidal de la zona CA1 (Fig. 24 y 25), midiendose la distancia en, tres oportunidades por campo, entre las células ganglionares y el paralelismo entre las mismas buscándose la presencia de dispersión (A). A nivel de la sustancia blanca se evaluó la presencia de espongiosis, una anomalía histológica consiste en la aparición de pequeñas vacuolas en el citoplasma de las células. El diámetro de estas vacuolas varia entre las 20 y 200 micras. Las vacuolas se forman en cada capa de la corteza cerebral y ,además, pueden agregarse para dar lugar a grandes vacuolas que distorsionan substancialmente la arquitectura citológica (Fig. 26).

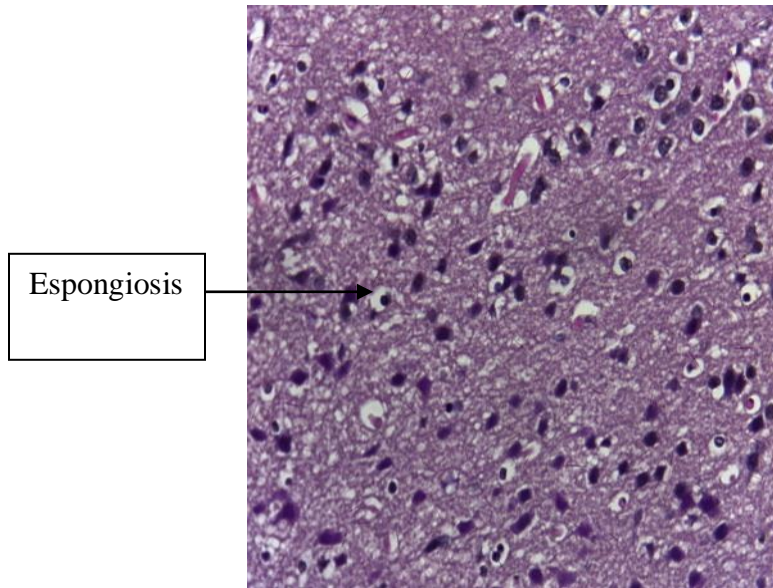


Fig. 26 Sustancia Blanca en la cual se observa espongiosis. H-E 40 x. Rata e-SS

#### 3.3.7.3 Inmunohistoquímica

Se evaluó la expresión del Ac antisinaptophysin (Dako Lab®) mediante detección inmunohistoquímica a través del sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa (DAB) en material del hipocampo incluido en parafina, en cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor. Este anticuerpo fue utilizado para estudiar la normalidad o afectación de las sinapsis en el hipocampo ( 118) (Fig. 27). Tales evaluaciones se realizaron comparando los diversos grupos experimentales con ayuda del atlas de referencia (119 y 120). La tinción con el Ac anti-A $\beta$  antibody se utilizó para observar depósitos de amiloide (121). El Ac anti-Proteína PG p9.5 (Fig. 28) , se utilizó para estudiar el citoesqueleto de las neuronas e identificarlas en el hipocampo (120) .

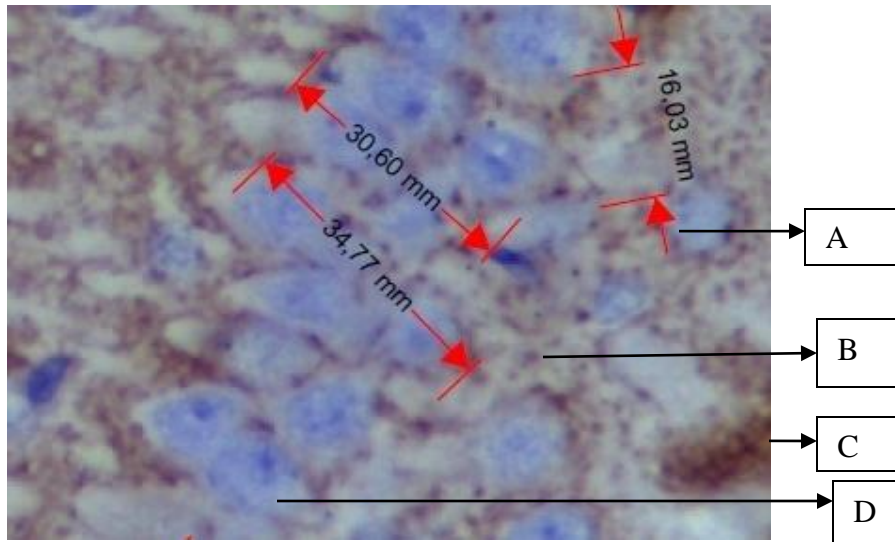


Fig. 27 Capa piramidal de la zona CA1 del Asta de Amón del Hipocampo Ac antisinaptofisina 40x de una rata Wistar (control no diabético). A) Dispersión espesor de la capa. B) Espesor de la capa . C) Ac Antisinaptofisina. D) contraste con violeta de cresilo. Nótese la fuerte inmunoreactividad citoplasmática

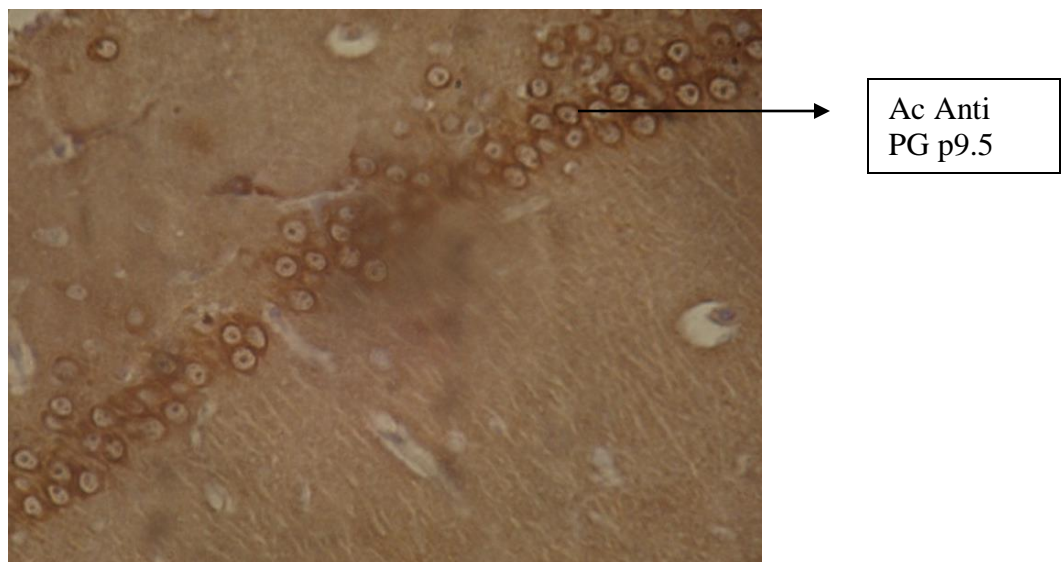


Fig. 28 Capa piramidal de la zona CA1 del Asta de Amón del Hipocampo Ac Proteína PG p9.5, contraste con eosina 40x. Rata Wistar (control no diabético)

### 3.4 Análisis estadístico:

Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. Las comparaciones entre los múltiples grupos se realizaron mediante ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn. Se utilizó la prueba t de Student apareado para analizar los resultados de OOGT. La significación estadística fue  $<0,05$  , se empleó el programa INFOSTAT 3.1 para los estudios estadísticos y se empleó el software GraphPad Prism 5 para el análisis de las imágenes.



## CAPITULO 4 RESULTADOS

### 4.4.2.3 Cromatografía de Gases (por su importancia se describe primero)

Tras la administración IP de los PUFAs desde el día 40 hasta los 12 meses, las ratas e-SS (diabéticas) en comparación, con Wistar, aumentaron los niveles de MUFAs registrándose una disminución significativa en los PUFAs  $\omega 3$  y  $\omega 6$  en las ratas e-SS control, como aquellos que recibieron AA. En cambio se obtuvieron valores similares de los perfiles AG comparables a los de las ratas Wistar en los animales tratados con  $\omega 3$ , con o sin NDGA. La dosis de AG debido a su baja concentración y al hecho que se administraron una vez al mes, su efecto calórico es despreciable, pero sí modificaron el perfil de los AG y la actividad de los PUFAs  $\omega 3$  relacionada con la inflamación, apoptosis, estrés oxidativo y expresión de la proteína sinaptofisina .

ACIDO GRASO	Control eSS	ω6	ω6+NDGA	ω3	ω3+NDGA	Wistar
14:0	0,5 ± 0,2	1,16 ± 0,5	0,9 ± 0,6	0,6 ± 0,05	0,7 ± 0,8	± 1,3
16:0	14,49 ± 4,7	32,26 ± 10,6	26,5 ± 11,7	15,4 ± 0,2	18 ± 8,4	± 6,4
18:0	8,14 ± 3,9	12,17 ± 2,7	10,6 ± 0,4	6 ± 1,1	6,5 ± 2,4	± 2,1
24:0	0,43 ± 0,3	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,007	0,2 ± 0,002	0 ± 0	± 0,3
<b>Saturados</b>	<b>23,56 *</b> ± 9,1	<b>45,89 **</b> ± 13,82	<b>38,2 **</b> ± 12,7	<b>22,2 **</b> ± 1,37	<b>25 *#</b> ± 11,6	<b>27,9 #</b> ± 10,1
14:1 ω9	0,34 ± 0,2	0,58 ± 0,04	1,1 ± 0,3	0,3 ± 0,05	1,3 ± 1,1	± 0,01
16:1 ω7	5,18 ± 4,1	1,66 ± 0,9	6,8 ± 1,5	9,8 ± 0,3	31 ± 1,6	± 0,2
18:1 ω9	21,5 ± 8,2	14,63 ± 6,6	13,3 ± 4,31	22,3 ± 0,8	13 ± 1,1	± 6,1
20:1 ω9	0,31 ± 0,2	0,34 ± 0,007	2,2 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0 ± 0	± 0,4
22:1 ω9	0,3 ± 0,3	0,25 ± 0,006	1 ± 0,02	0 ± 0	0 ± 0	± 0,1
<b>Monoinsaturados</b>	<b>27,6 *</b> ± 13	<b>17,46 **</b> ± 7,533	<b>24,5 **</b> ± 6,43	<b>33,3 #</b> ± 6,43	<b>45,4 *</b> ± 3,8	<b>22,5 #</b> ± 6,81
18:2 ω6	23,7 ± 5,8	19,75 ± 0,08	15,2 ± 2,7	27,6 ± 0,1	8,6 ± 1,4	± 9
18:3 ω6	5 ± 5,4	1,22 ± 0,002	1,2 ± 0,6	0 ± 0	1,6 ± 0,05	± 0,02
18:3 ω3	1,5 ± 0,6	0,22 ± 0,001	1,3 ± 0,3	3,9 ± 0,5	13,6 ± 1,5	± 0,9
20:2 ω6	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,005	1,2 ± 0,06	0,2 ± 0,02	0 ± 0	± 0,3
20:3 ω3	1,2 ± 0,7	0,08 ± 0,01	1,5 ± 1	8 ± 0,2	2,3 ± 0,5	± 0,2
20:4 ω6	9,2 ± 3,2	9,2 ± 0,3	6,1 ± 1	0,8 ± 0,02	1,7 ± 0,3	± 3,4
20:4 ω3	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,01	0 ± 0	2,3 ± 0,05	0 ± 0	± 0,2
22:6 ω3	0,0 ± 0	0,2 ± 0,01	1,1 ± 0,3	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02	± 0,4
22:5 ω3	1,1 ± 1,3	1,13 ± 0,01	2,3 ± 0,08	1,4 ± 0,05	3,1 ± 0,4	± 0,1
<b>PUFAs ω3</b>	<b>4 *</b> ± 2,9	<b>1,83</b> ± 0,036	<b>6,2</b> ± 1,63	<b>15,1</b> ± 0,81	<b>19,3 *</b> ± 2,42	<b>16,4 #</b> ± 1,8
<b>PUFAs ω6</b>	<b>38,2</b> ± 14,4	<b>30,37 *#</b> ± 0,39	<b>23,7 #</b> ± 4,36	<b>29 #</b> ± 0,14	<b>12 #</b> ± 1,75	<b>38 #</b> ± 12,72
<b>Poliinsaturados Totales</b>	<b>42,2</b> ± 17,3	<b>32,2</b> ± 0,423	<b>29,1</b> ± 5,99	<b>44</b> ± 0,95	<b>31,1</b> ± 4,17	<b>54,3</b> ± 14,52

TABLA 2: Perfiles de ácidos grasos totales en plasma.

## 4.1 Marcadores Clínicos

### 4.1.1 Peso Corporal

En la etapa de post-destete (45 días de edad), las ratas e-SS mostraron un mayor peso en el segundo mes en comparación con el grupo Wistar. Sin embargo todos los grupos alcanzaron un peso similar al año de estudio. Es importante destacar que no se observó obesidad en ninguno de los grupos.

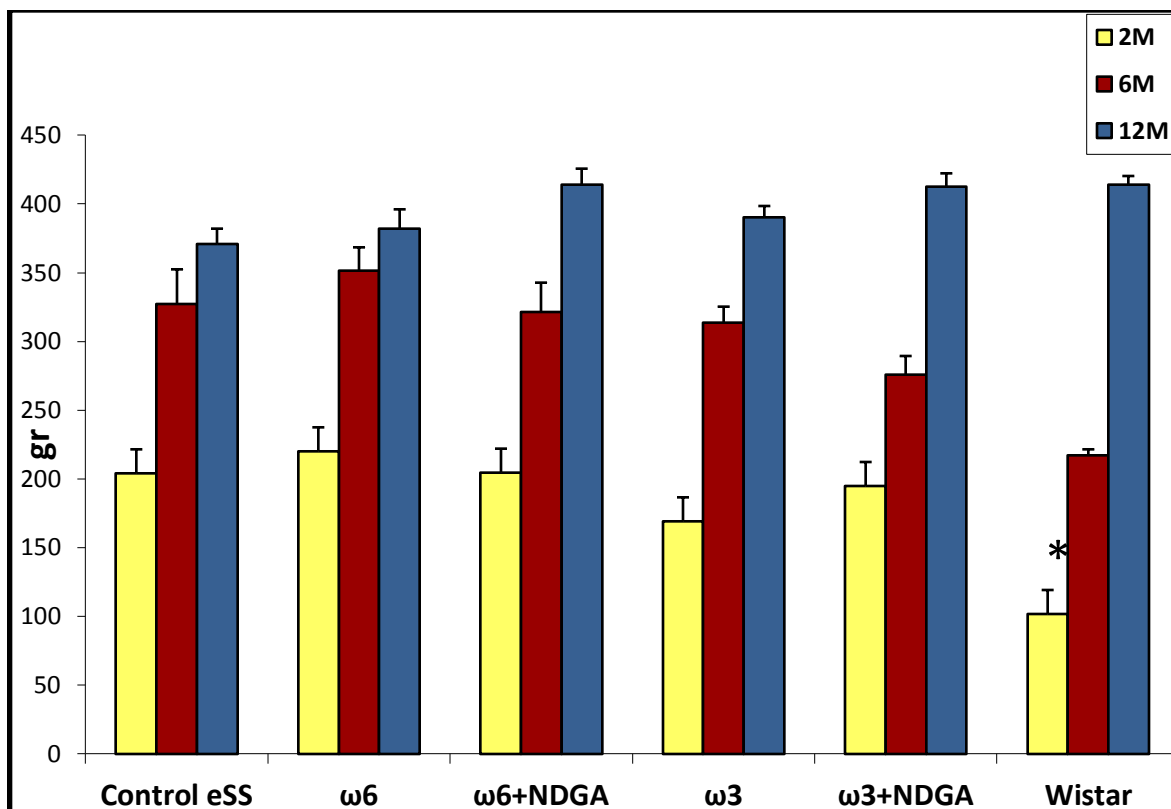


Fig. 29: Peso de los animales a los 45 días, 6 y 12 meses. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica la diferencia significativa,  $p < 0.05$ .

#### 4.1.2 Estudio de la conducta animal "Hole Board Test" o Test del Hueco

Como se dijo las pruebas cognitivas se realizaron en 20 animales de cada grupo a los 6 meses y en 18 animales de cada grupo a los 12 meses sobre un total de 20 por cada grupo e-SS y 38 del grupo Wistar. Los exámenes de comportamiento mostraron una mayor actividad motora en el grupo e-SS a los 6 meses comparado con las ratas Wistar (control sano).

A los 12 meses estos parámetros se modificaron pues los animales e-SS control (sin tratamiento), tuvieron un peor desempeño que los animales Wistar (control no diabético). En cambio los grupos de animales diabéticos que recibieron NDGA +  $\omega$ 6, NDGA+  $\omega$ 3, o solo  $\omega$ 3, tuvieron un desempeño más parecido a las ratas Wistar (control no diabético) (Fig. 30). Al observar las actividades de búsqueda específica compatible con una salida de escape, como lo es el "*Head-Deep*", en el cual el animal introduce la cabeza en un hueco de la base de la caja, se registró un comportamiento similar al ítem "Movimiento". Lo cual también se pudo observar al estudiar el parámetro "*Rear*", observándose una creciente dificultad en todos los animales aún los Wistar pero significativamente mayor en los grupos e-SS control (sin tratamiento) y al grupo  $\omega$ 6 probablemente asociada al envejecimiento. Los grupos que recibieron NDGA +  $\omega$ 6, NDGA+  $\omega$ 3, o solo  $\omega$ 3, tuvieron un desempeño más semejante al de las ratas Wistar.

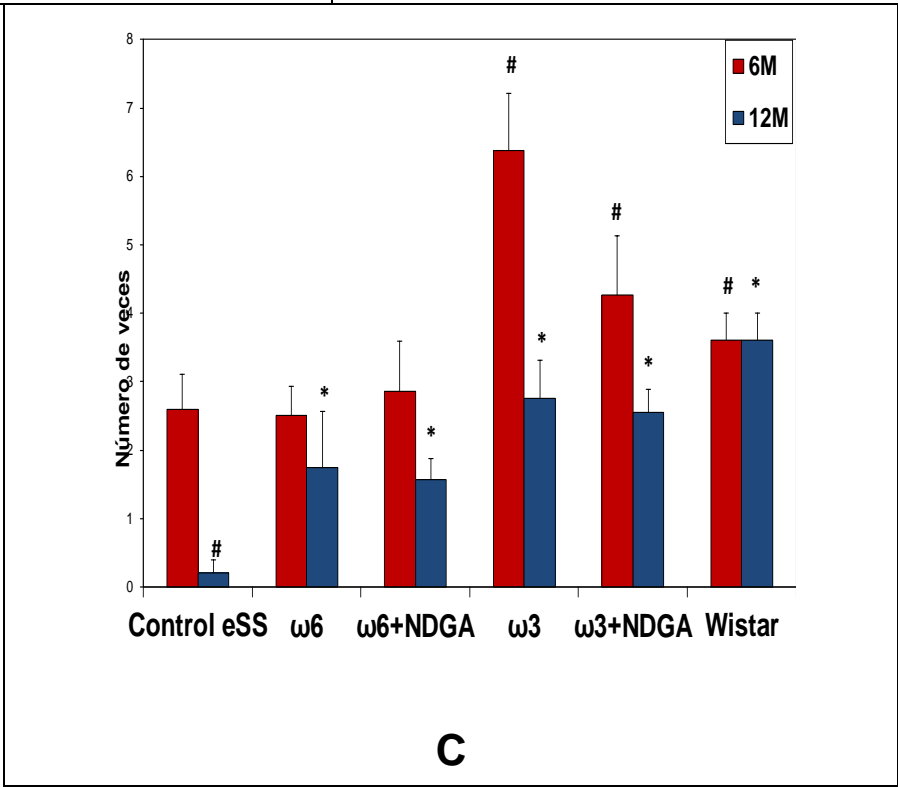
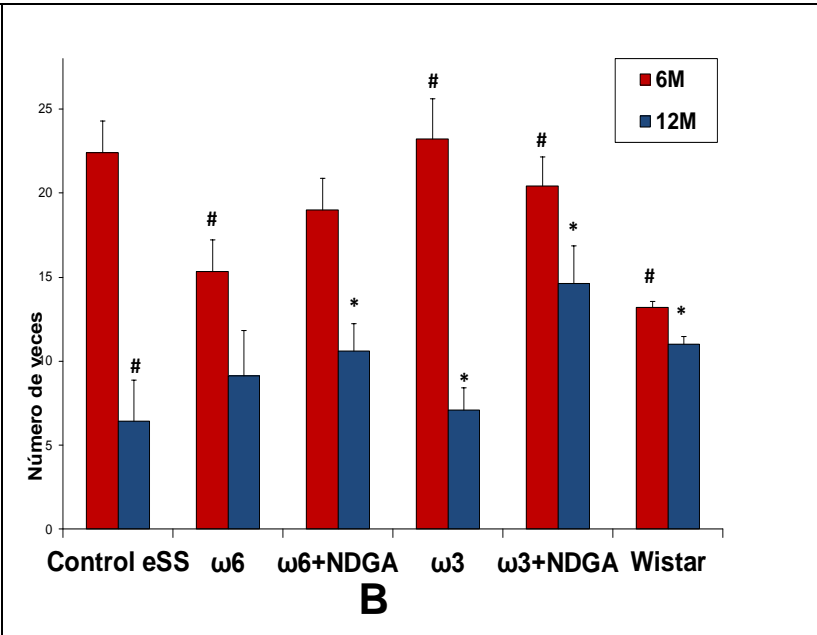
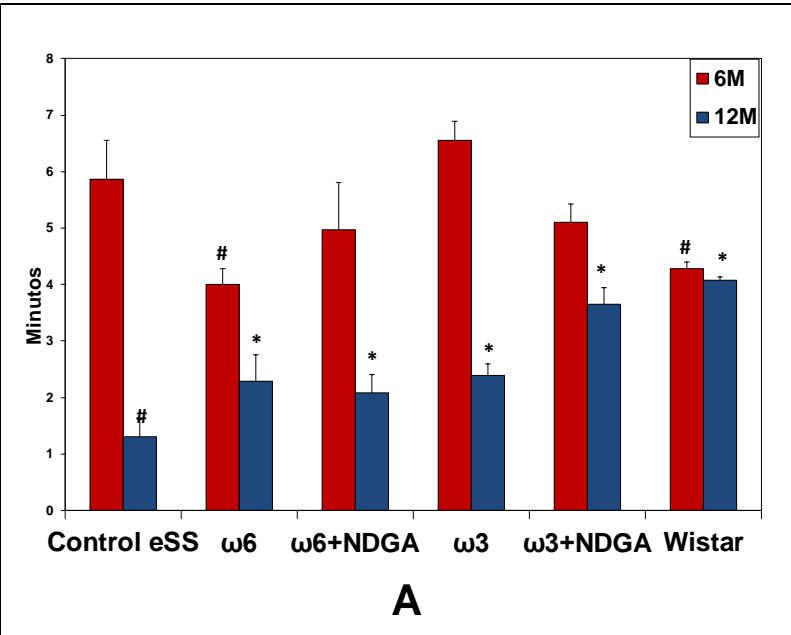


Fig. 30: Prueba del hueco-“Hole Board Test” A) Movimiento: tiempo durante el cual el animal se moviliza. B) “Head-Deep”: veces en las cuales el animal introduce la cabeza en uno de los huecos. C) “Rear”: de veces en las que el animal se para sobre sus patas traseras. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. # y \* Indican diferencia significativa para el Control e-SS a los 12 meses,  $p = 0.05$ .

### 4.1.3 Sobrevida Animal

Estas observaciones se describen al final como hallazgo adicional ya que se observó en aquellos animales que no fueron sacrificados para otras observaciones.

El grupo e-SS control (diabéticas sin tratamiento) mostró una supervivencia significativamente menor al grupo Wistar (control no diabético) y que los animales tratados con  $\omega 6$  + NDGA,  $\omega 3$  y  $\omega 3$  + NDGA o ( $p < 0,05$ ) que alcanzaron los 30 meses de vida.

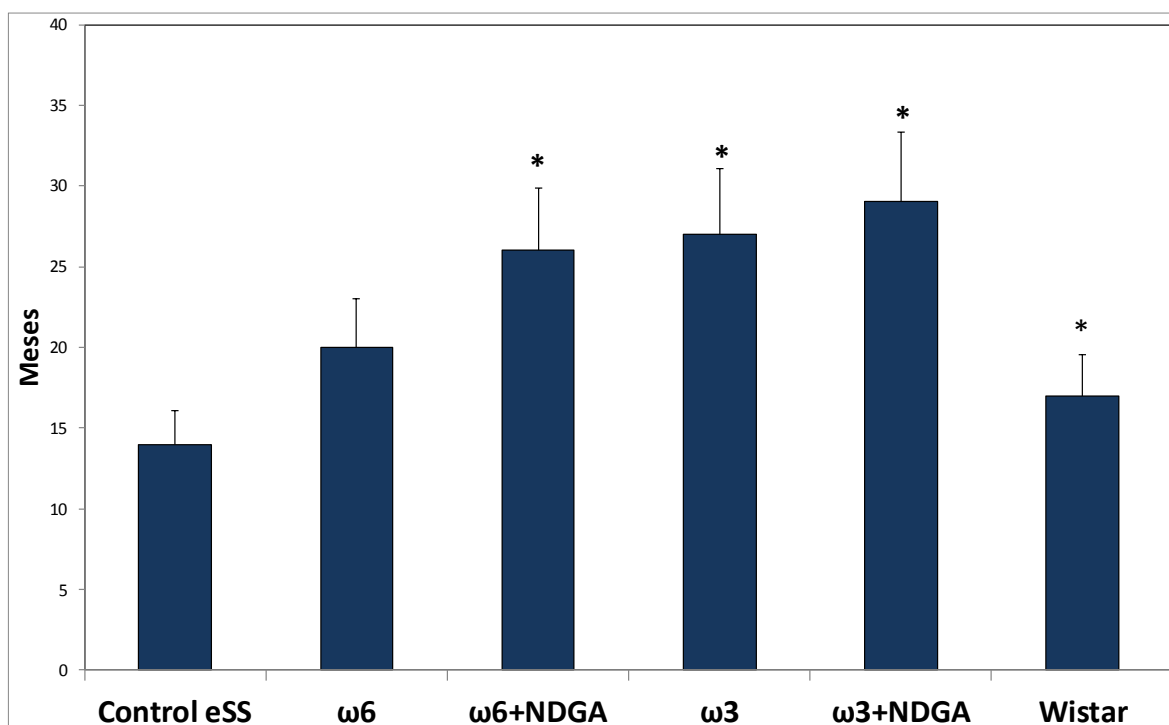


Fig. 31 Sobrevida Los tiempos de supervivencia de las cohortes de animales. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica la diferencia significativa ,  $p \leq 0.05$

## 4.2 Estudio de Diagnóstico por imágenes Tomografía Axial Computada (TAC)

Heterogeneidad en la sustancia blanca Los animales que recibieron NDGA + $\omega$ 6 o NDGA+  $\omega$ 3, o solo  $\omega$ 3, mostraron imágenes más parecidas a las ratas Wistar (control no diabético, imágenes homogéneas)

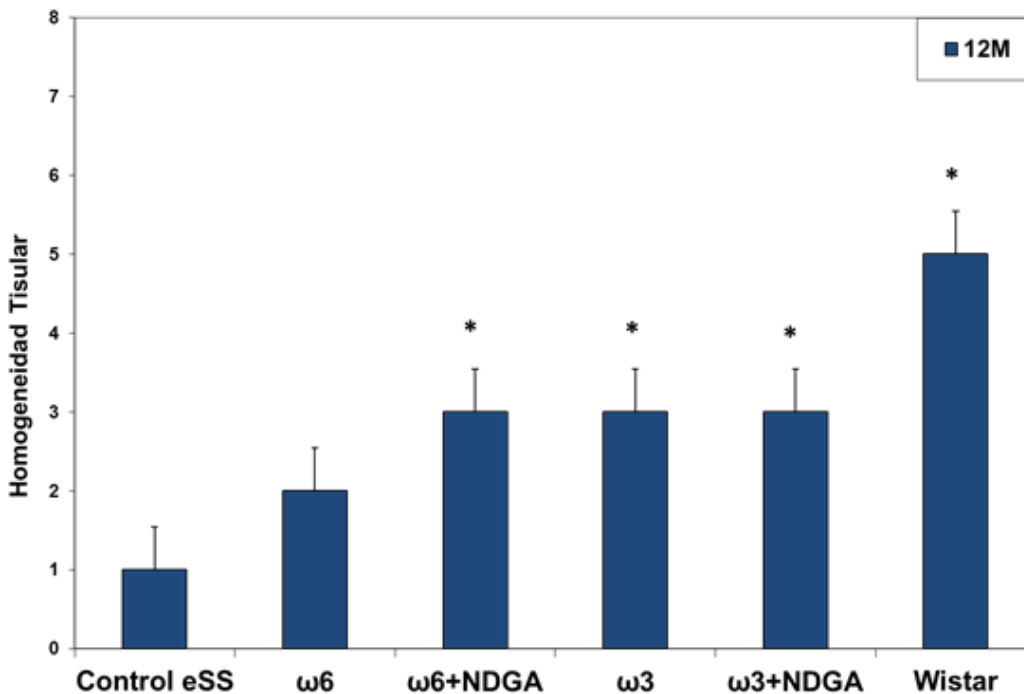
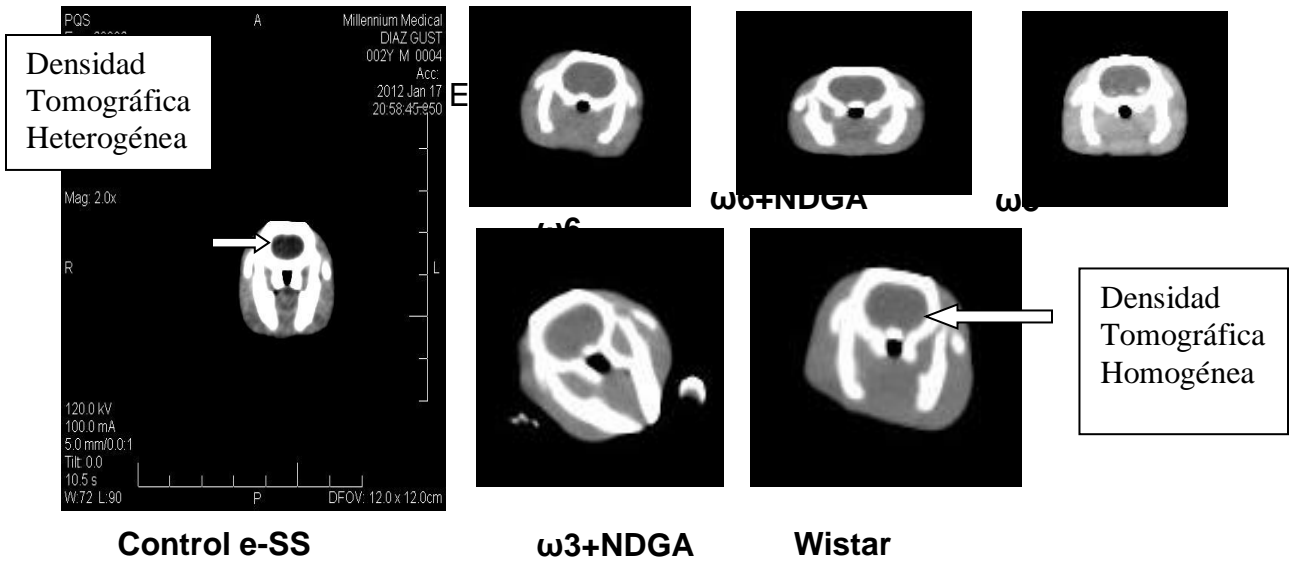


Fig. 32 : TAC Imágenes y su análisis, se observa pérdida de la homogeneidad tisular a los 12 meses, evidente en el grupo e-SS control (sin tratamiento). Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indican la diferencia significativa vs el grupo control e-SS,  $p \leq 0.05$

### 4.3 Determinaciones Bioquímicas:

#### 4.3.1 Parámetros relacionados con la glucemia

##### 4.3.1.1 Glucemia en Ayunas y 4.3.1.2 Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG)

En las ratas e-SS se observó glucemia en ayunas y postprandial normal a los dos meses de edad y valores anómalos, compatibles con la condición de diabetes en el 6<sup>o</sup> mes. Dichos valores plasmáticos se mantuvieron elevados hasta el final del experimento a los 12 meses. No hubo diferencias estadísticas asociadas a los tratamientos efectuados entre los grupos diabéticos. La glucemia en ayunas del grupo Wistar (control no diabético) se mantuvo en rangos normales que oscilaron entre 80 y 100 mg/dl a lo largo del período experimental (Fig.32).

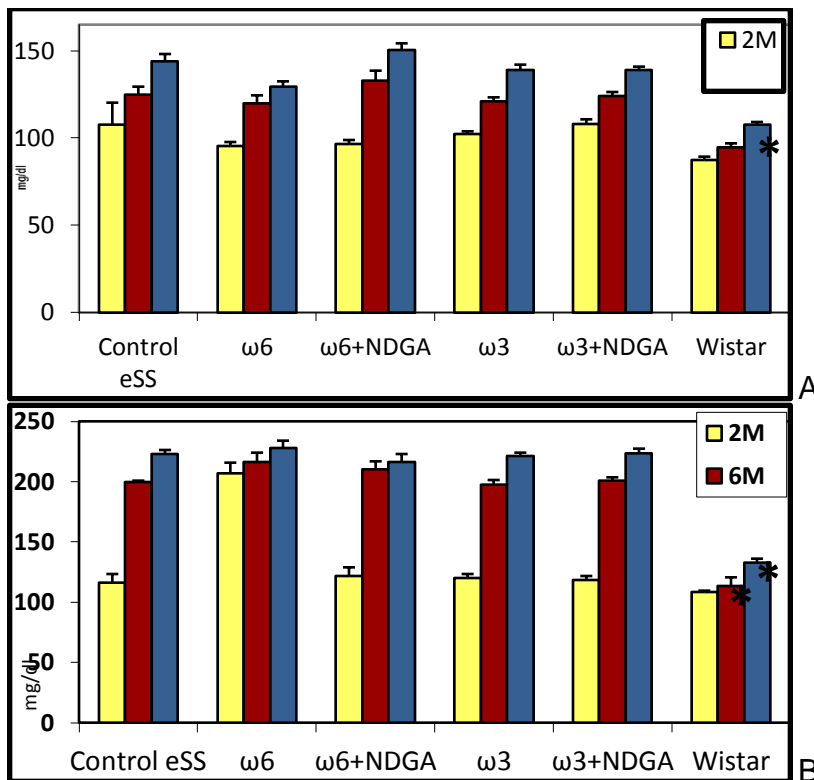


Fig. 33: Dosaje de la Glucemia. PTOG de los animales a los 2, 6 y 12 meses. A) Glucemia en ayunas, B) Glucemia postprandial. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indican diferencia significativa vs el grupo Control e-SS,  $p \leq 0.05$ .



#### 4.3.1.3 Hemoglobina Glicosilada ( HbA1c)

En las ratas e-SS se observaron valores de HbA1c compatible con diabetes en el 6<sup>o</sup> mes alcanzando valores de 7.8 a 8 mg/dl que se mantuvieron hasta finalizado el experimento a los 12 meses. No hubo diferencias entre los diferentes tratamientos realizados a los grupos diabéticos. El grupo Wistar se mantuvo en un rango normal de 5 mg/dl a lo largo de todo el experimento (Fig.33).

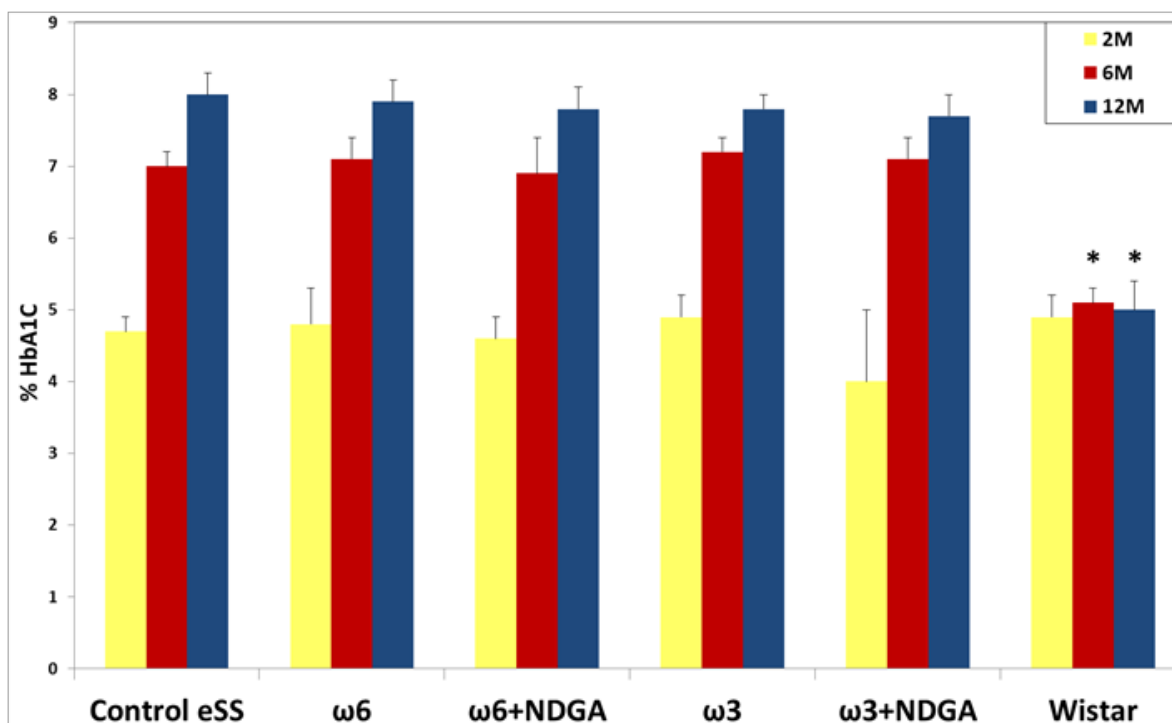


Fig. 34: Dosaje de la HbA1c. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indican diferencia significativa vs el grupo Control e-SS,  $p \leq 0.05$ .

### 4.3.2 Parámetros relacionados con el metabolismo lipídico

#### 4.3.2.1 Trigliceridemia (TG) y 4.3.2.2 Colesterolemia (Col)

Se pudo observar que todos los grupos estudiados tuvieron valores normales cercanos a los 120 mg/dl hasta los 45 días de edad. En los animales diabéticos a los 6 meses de edad estos valores se incrementaron a valores patológicos que superaron los 200 mg/dl. Se pudo observar una diferencia no significativa entre los diferentes tratamientos. Así, los animales tratados con  $\omega 3$  mostraron valores de 200 a 230mg/dl llegando a 250mg/dl en las ratas control (sin tratamiento) y se mantuvieron elevados hasta los 12 meses en que finalizó el experimento. El grupo Wistar se mantuvo durante toda la experiencia en valores normales que oscilaron entre 80 y 120mg/dl (Fig 34A). Los valores plasmáticos de Col total se mantuvieron dentro de valores que oscilaron entre 90 y 120 mg/dl en todos los grupos sin diferencias significativas entre ellos. (Fig.34 B).

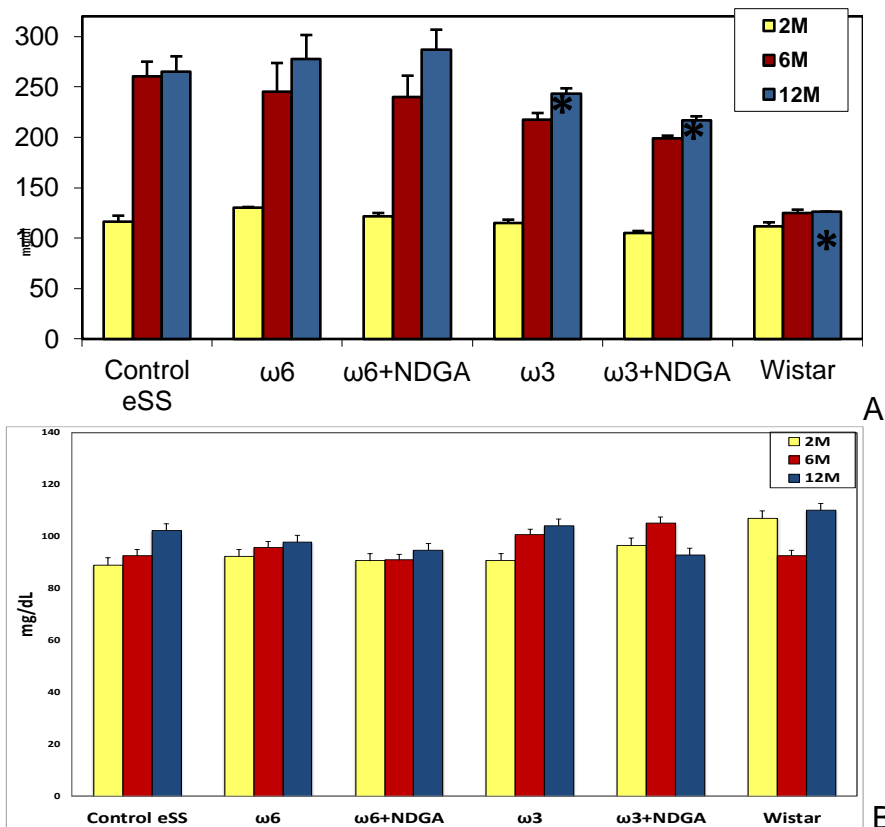


Fig. 35: Dosaje de los Triglicéridos plasmáticos A y Colestro B. A los 2, 6 y 12 meses. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indican diferencia significativa vs el grupo Control e-SS,  $p \leq 0.05$

### 4.3.3 Parámetros relacionados con la inflamación

#### 4.3.3.1 Proteína C Reactiva Ultrasensible (PCR)

En este trabajo se consideró que los valores normales de PCR en las ratas son normales hasta 3.0 mg/L (121). Se observó que a los 12 meses los niveles plasmáticos de PCR se incrementaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en las ratas e-SS en comparación con las Wistar. Los grupos que recibieron NDGA+  $\omega 6$  o NDGA+  $\omega 3$  o solo  $\omega 3$ , mostraron valores más bajos de PCR que los no tratados, especialmente cuando recibieron NDGA+  $\omega 3$ . Las ratas Wistar mostraron dichos valores normales en todo el experimento (Fig.35).

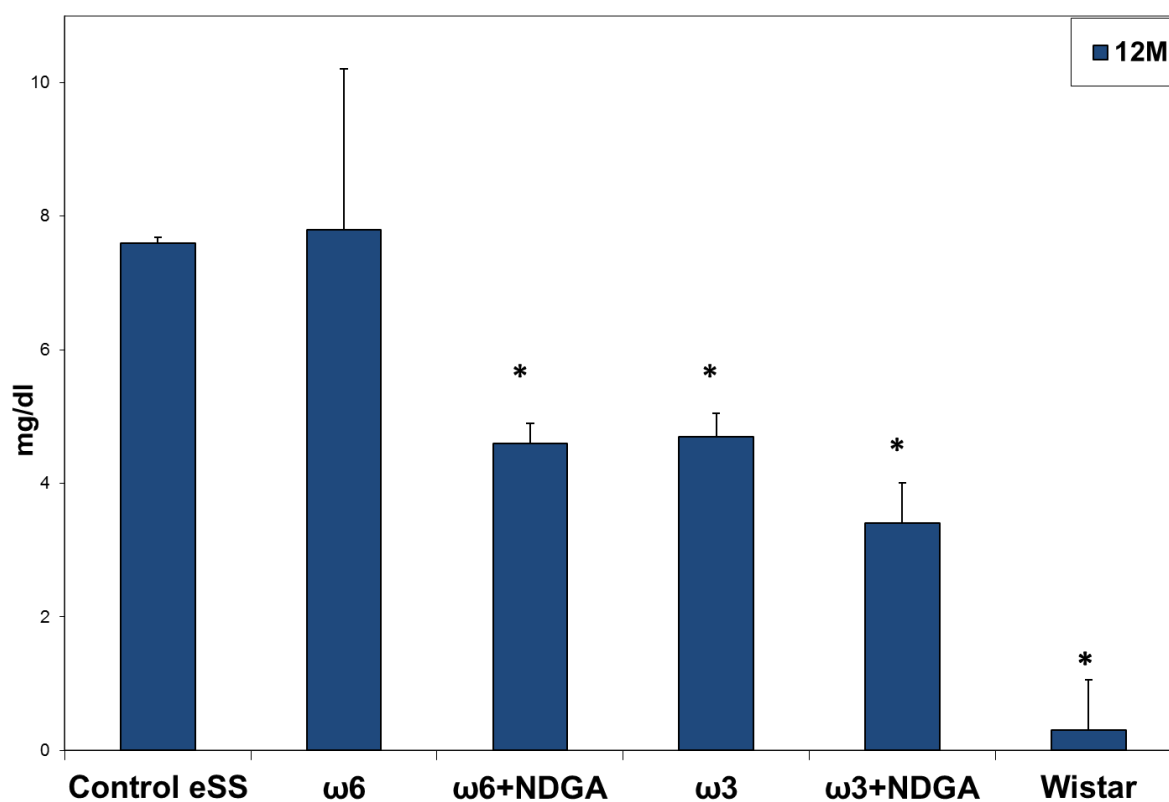


Fig. 36: Los niveles de PCR plasmática de los animales a los 12 meses. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica diferencia significativa vs en grupo Control e-SS,  $p \leq 0.05$

#### 4.3.3.2 y 4.3.3.3 IL-6 en Plasma e Hipocampo

A los 12 meses, tanto en plasma (medido por ELISA) como en hipocampo (medido por PCR) los valores de IL-6 hallados fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que en los grupos e-SS control y en los que recibieron sólo  $\omega 6$ , o  $\omega 3$ . Dichos niveles fueron menores en los tratados con NDGA. Las ratas Wistar (control sano) presentaron los valores más bajos, considerados como normales (Fig.36).

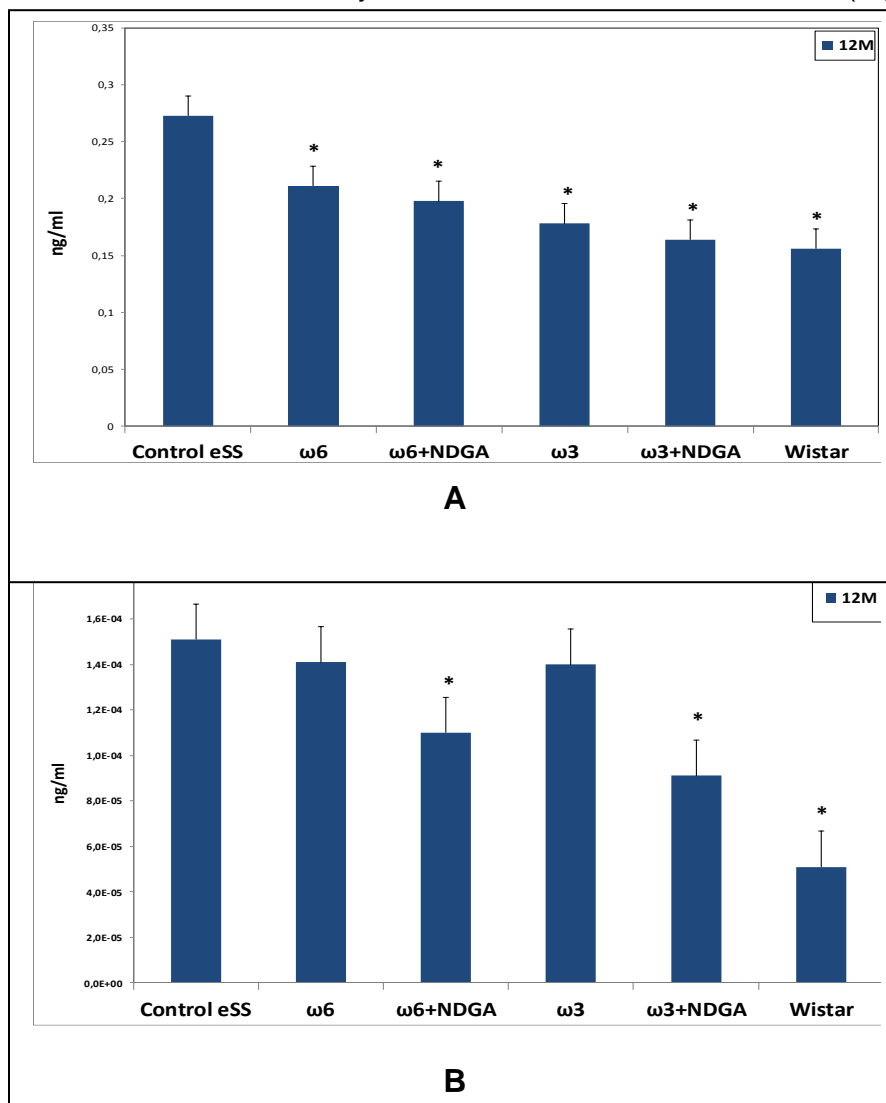


Fig. 37. Niveles de IL-6 en Plasma e Hipocampo. A) IL-6 plasmática. B) IL-6 Hipocampo de los animales a los 12 meses. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica diferencia significativa vs el grupo Control e-SS,  $p \leq 0.05$ .

#### 4.3.4 Parámetros relacionados con estrés oxidativo

##### 4.3.4.1 y 4.3.4.2 Actividad de Gama Glutamiltanspeptidasa (GGT) en Plasma y tejido Cerebral

Las ratas e-SS a los 12 meses mostraron altos niveles de GGT en plasma y tejido cerebral. En contraste en el plasma de los animales tratados con NDGA hubo disminución de los valores de GGT en relación con los animales control, acercándose a los valores observados de las ratas Wistar (control no diabético). En el tejido cerebral sólo el grupo tratado con  $\omega 3$  + NDGA presentó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la actividad de la GGT, presentando el grupo Wistar los valores más bajos (Fig.37).

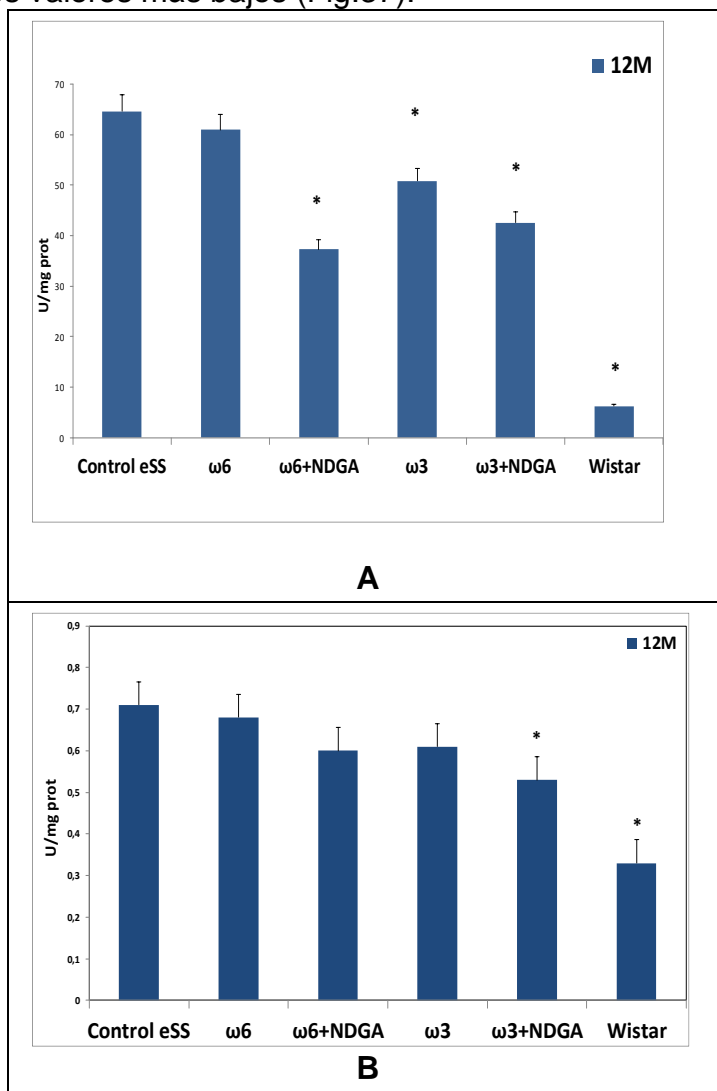


Fig. 38: Actividad de GGTP . (A) el plasma y (B) en tejido cerebral de los animales a los 12 meses. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica diferencia significativa vs el grupo control e-SS,  $p \leq 0.05$

#### 4.3.4.3 y 4.3.4.4 Lipoperóxidos e Hidroperóxidos plasmáticos

Las ratas e-SS, a los 12 meses tienen altos niveles de lipoperóxidos e hidroperóxidos en plasma. En cambio en los animales tratados con NDGA +  $\omega 6$  o NDGA +  $\omega 3$ , ó solo  $\omega 3$ , se registró una disminución de los valores en relación con los animales control, acercándose los mismos a los registrados en las ratas Wistar (control no diabético) (Fig.38).

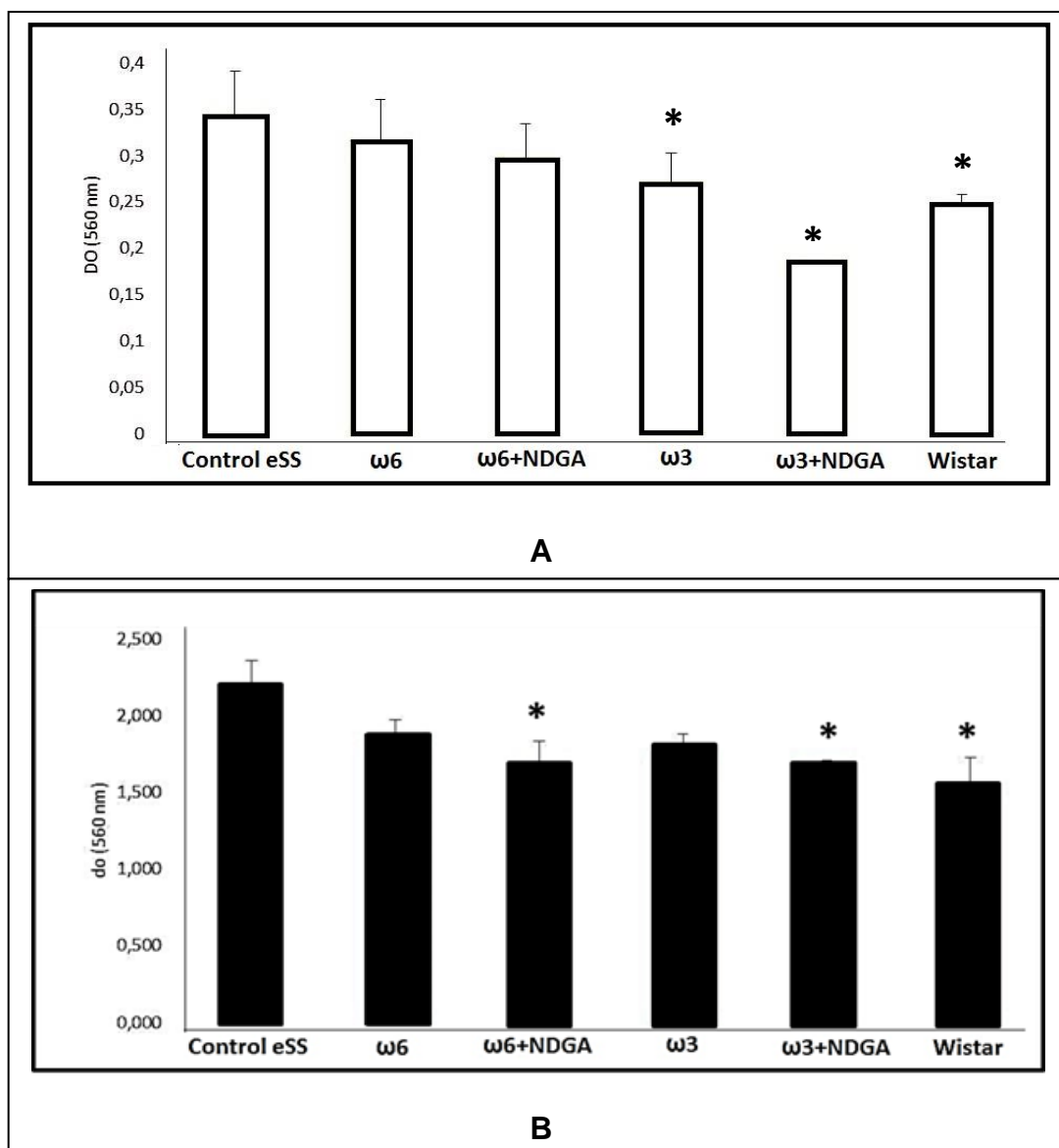


Fig. 39: A) Actividad de los Lipoperóxidos B) Actividad de los Hidroperóxidos en el plasma de los animales a los 12 meses. Datos expresados como media  $\pm$  SEM.

\* Indica diferencia significativa vs el grupo Control e-SS,  $p \leq 0.05$ .

#### 4.3.5 Parámetros relacionados con apoptosis

##### 4.3.1 Citometría de Flujo en tejido de hipocampo

Las ratas e-SS control mostraron a los 12 meses en hipocampo valores de recuento de apoptosis significativamente mayores a la cuantificación observada en los otros grupos. Los grupos Wistar (control no diabético) y  $\omega 3$  mostraron los recuentos más bajos de apoptosis ( $p < 0,05$ ) (Fig.39).

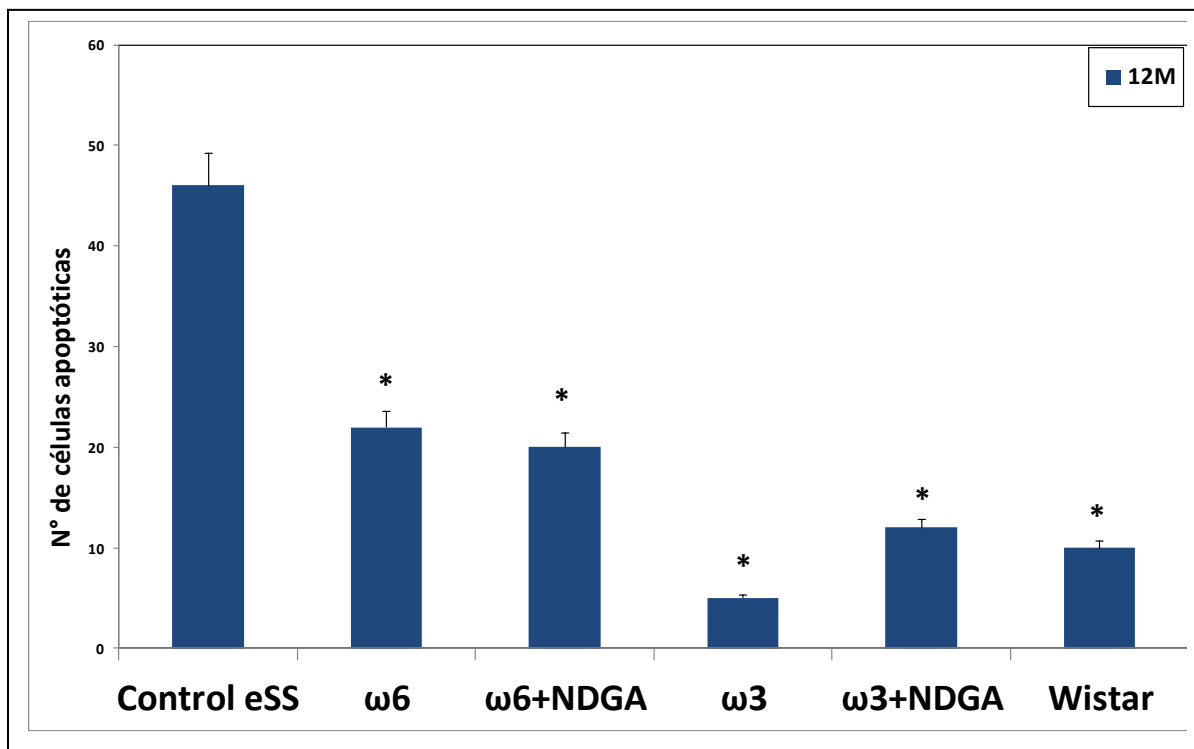


Fig. 40: Recuento de Apoptosis por Citometría de Flujo en hipocampo a los 12 meses de edad. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica una diferencia significativa vs el grupo Control e-SS,  $p \leq 0.05$

#### 4.3.2 Técnica del TUNEL en Hipocampo

Esta determinación se realizó a los 12 meses y se buscó con ella visualizar la presencia de apoptosis en hipocampo, analizarla con el software GraphPad Prism 5 para compararla con el estudio de citometría de flujo. Como se puede observar en las (Fig.39y 40). Los animales Wistar (control sano) también presentan apoptosis, si bien en mucho menor grado que los animales e-SS sin tratamiento.

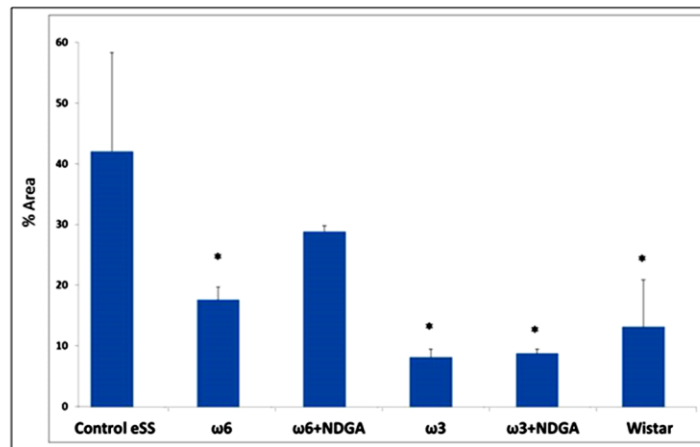
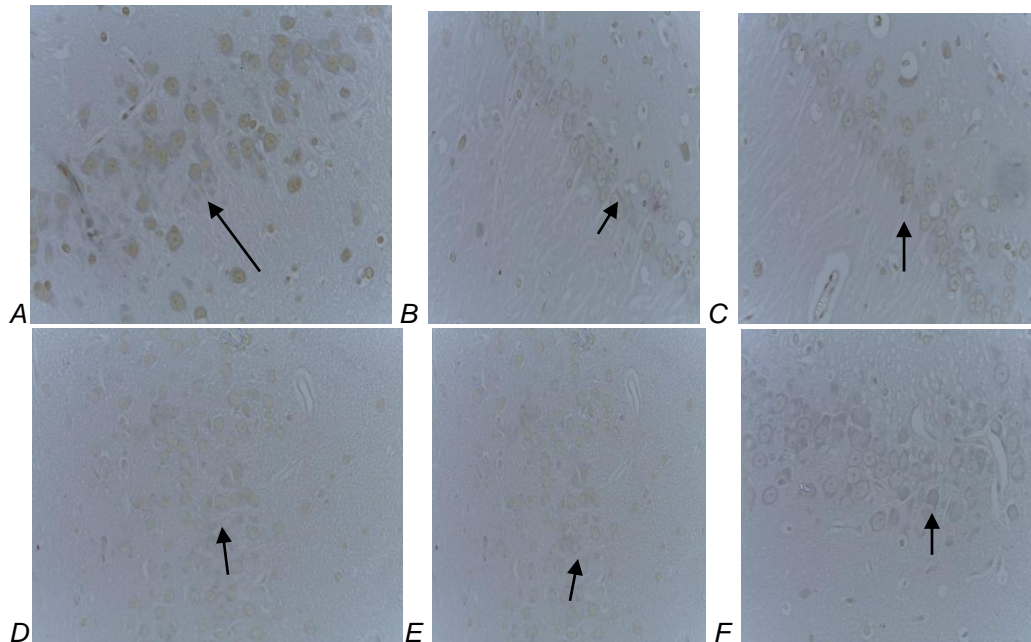


Fig. 41 Estudio de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL en Hipocampo. A)Control e-SS (sin tratamiento). B)  $\omega 6$ . C) NDGA+ $\omega 6$ . D)  $\omega 3$ . E) NDGA+ $\omega 3$  y F) Wistar (control no diabético) y Análisis de la presencia de células apoptóticas. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica diferencia significativa vs el grupo Control eSS,  $p \leq 0.05$



#### 4.4 Estudios Morfológicos y Morfométricos

##### 4.4.1 Estudio Histopatológico de la Sustancia Blanca

Examen histopatológico con H-E, las ratas e-SS control diabética evidenciaron severas lesiones compatibles con espongiosis significativamente mayores que los recuentos observados en los otros grupos de animales e-SS. El grupo Wistar no presentó lesiones de espongiosis (Fig. 41).

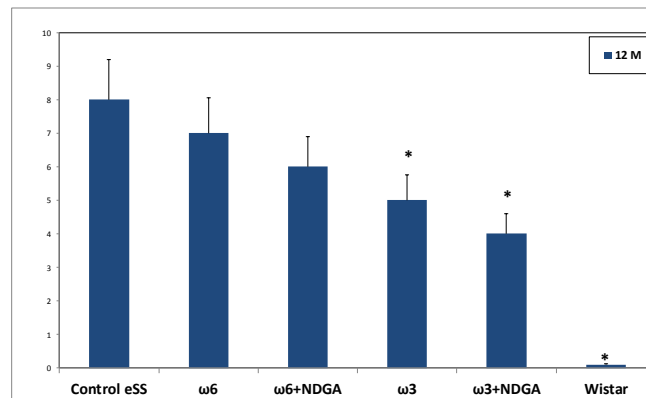
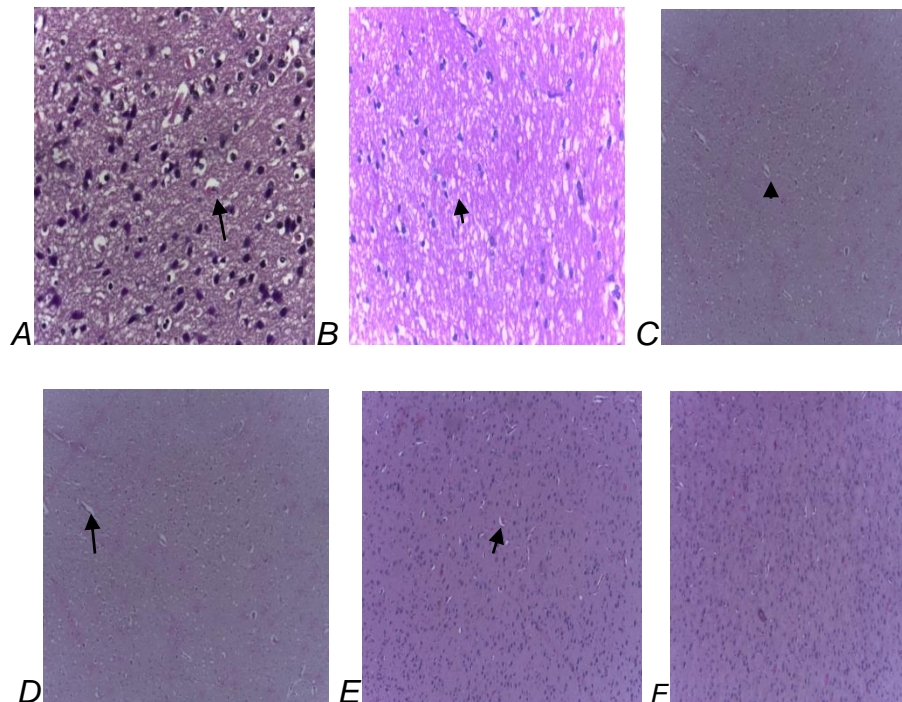


Fig.42 Imágenes de la Sustancia Blanca H-E 40 x. Espongiosis ( $\rightarrow$ ) A) Control e-SS, B)  $\omega 6$ , C) NDGA+ $\omega 6$ , D)  $\omega 3$ , E) NDGA+ $\omega 3$  y F) Wistar (control no diabético) y Análisis Colorimétrico software Graph Pad Prism 5 sobre una escala arbitraria. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica diferencia significativa vs el grupo control e-SS,  $p \leq 0.05$

#### 4.4.2 Estudio Histopatológico de la zona CA1 del Hipocampo

Examen del espesor y dispersión celular en la zona de CA1 del hipocampo mediante la observación a 40x de preparados teñidos con H-E y Nissl mostró que las ratas e-SS control evidenciaron lesiones compatibles con ED. En el grupo de animales e-SS el daño celular, la disminución del espesor y la dispersión fueron estadísticamente mayores ( $p < 0,05$ ), que las Wistar (Fig.42, 43 y 44). Los animales tratados con  $\omega 3$  y NDGA +  $\omega 3$  presentaron resultados con lesiones estadísticamente menores que el grupo e-SS control o los tratados con  $\omega 6$  o NDGA+ $\omega 6$ .

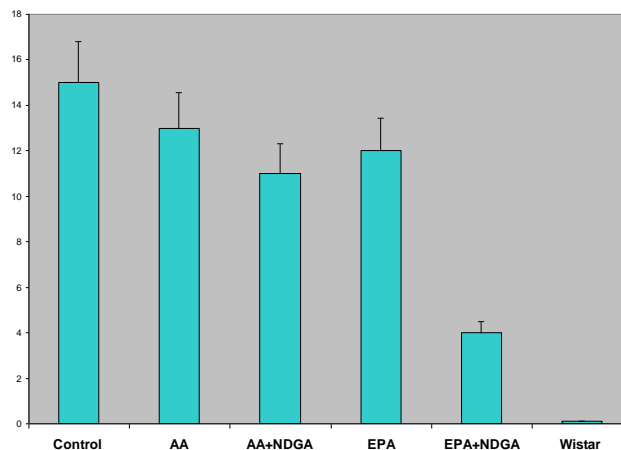
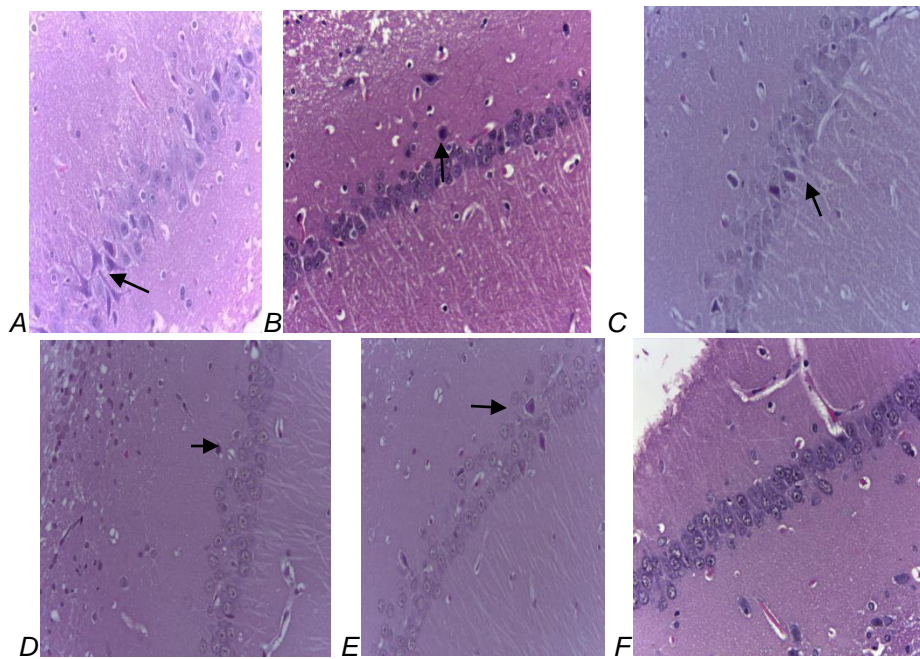


Fig. 43 Hipocampo Zona CA1 H-E 40 x. Lesión neuronal (→) A) Control e-SS , B)  $\omega 6$ , C) NDGA+ $\omega 6$ , D)  $\omega 3$ , E) NDGA+ $\omega 3$  y F) Wistar .Análisis Colorimétrico software GraphPad Prism 5. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica diferencia significativa vs el grupo control e-SS,  $p \leq 0.05$

#### 4.4.3 Estudio Histopatológico de la zona CA1 del Hipocampo

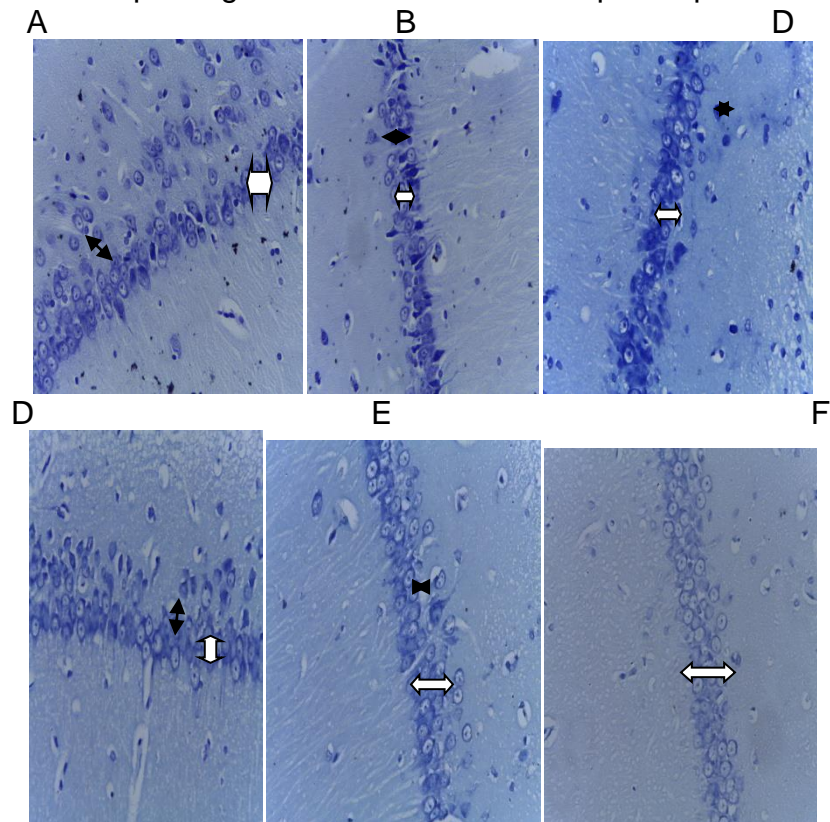


Fig. 44 Zona CA1 del Hipocampo Dispersión (↔) Espesor (⟷) Nissl 40x

A) Control e-SS (sintratamiento), B)  $\omega_6$ , C) NDGA+ $\omega_6$ , D)  $\omega_3$ , E) NDGA+ $\omega_3$ , F) Wistar

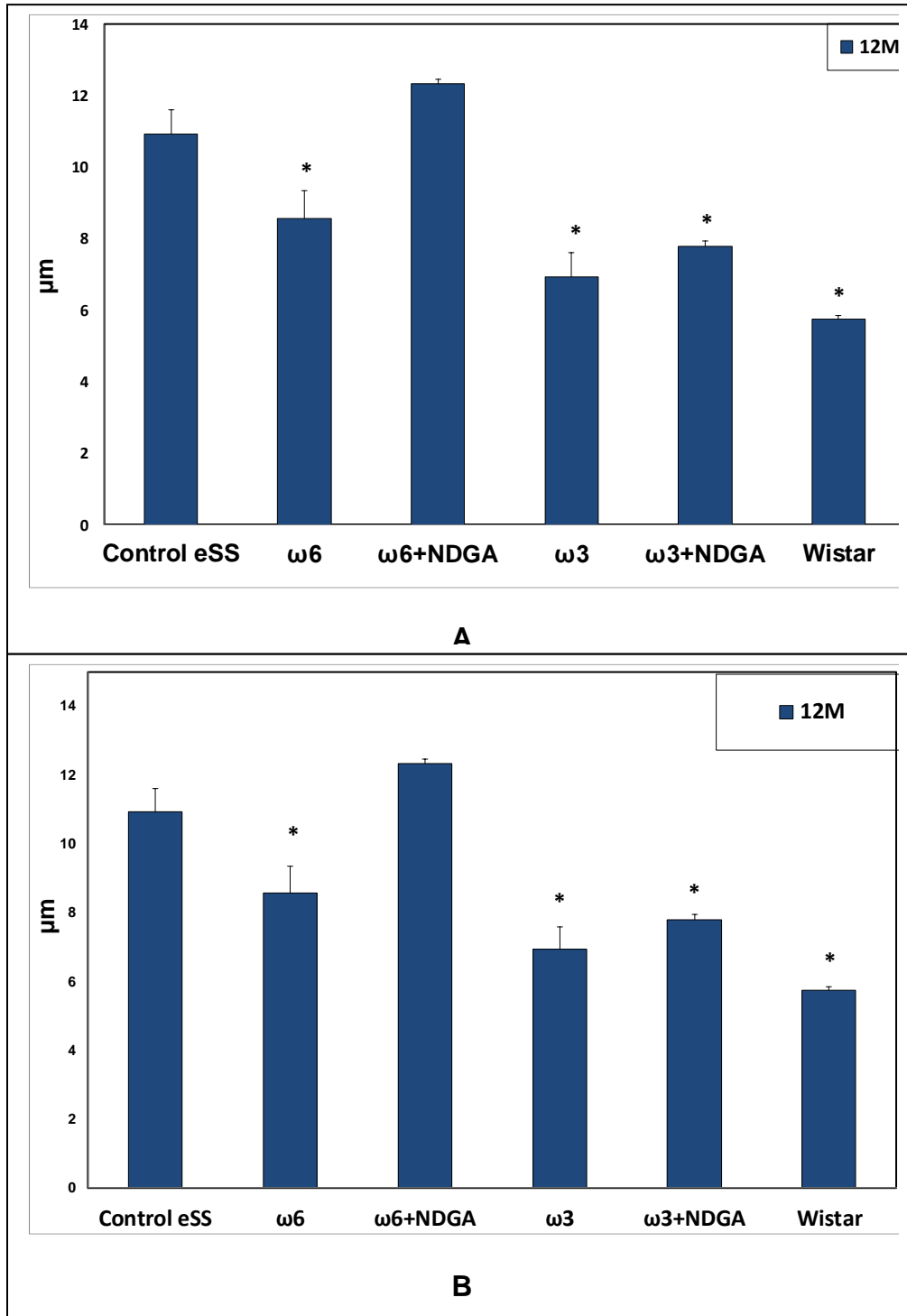


Fig. 45 Análisis de la capa piramidal de la Zona CA1 del Hipocampo A) Dispersión. B) Espesor. En base al software GraphPad Prism 5. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica diferencia significativa vs el grupo control e-SS,  $p \leq 0.05$

#### 4.4.4 Estudio Histopatológico del Giro Dentado

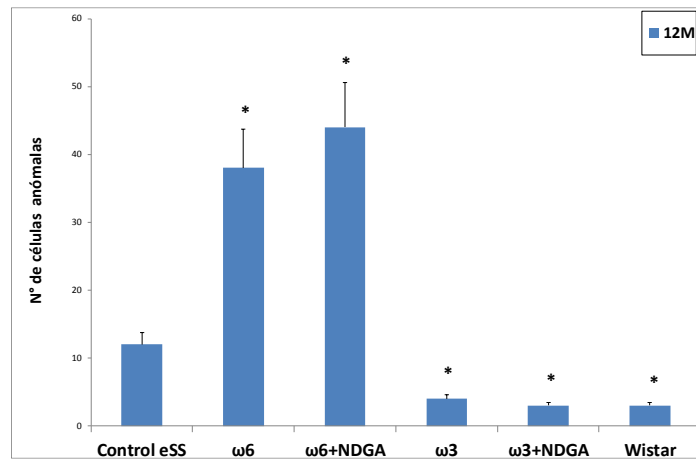
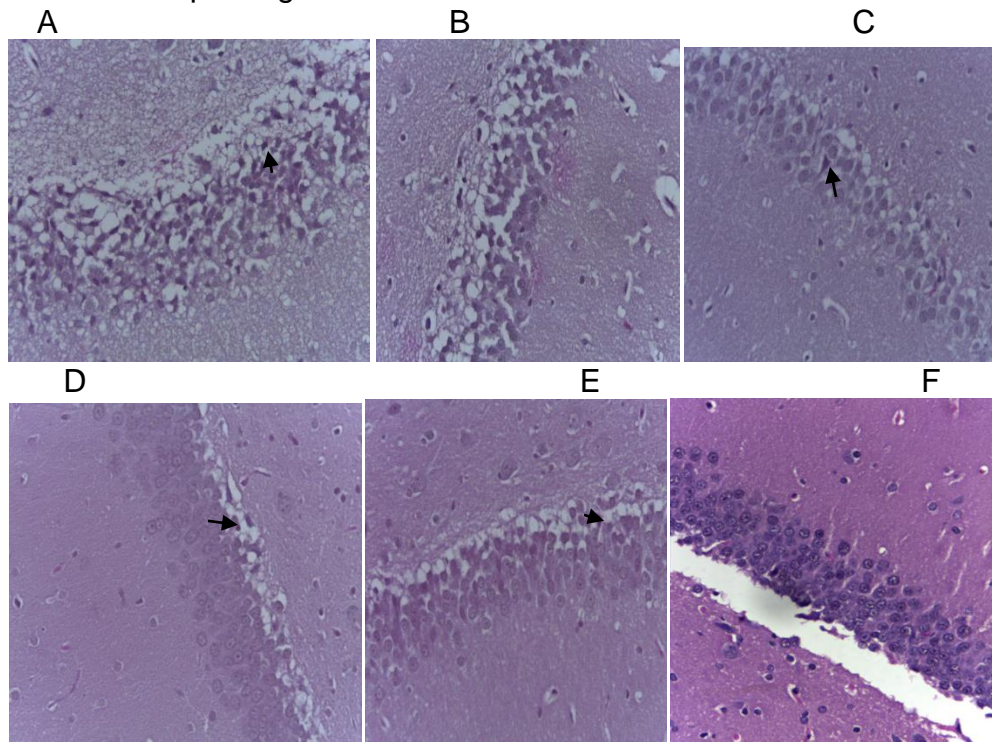


Fig. 46 Giro Dentado. Imágenes de lesión neuronal (→) H-E 40x A) Control e-SS (sin tratamiento), B)  $\omega$ 6, C) NDGA+ $\omega$ 6, D)  $\omega$ 3, E) NDGA+ $\omega$ 3, F) Wistar (control no diabético). Análisis de las imágenes con software ImageJ para realizar las mediciones. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica diferencia significativa vs el control e-SS,  $p \leq 0.05$ .

#### 4.4-5 Inmunohistoquímica Marcación de Sinaptofisina

Detección de sinaptofisina efectuada a los 12 meses en la zona CA1 del hipocampo los animales sin tratamiento (e-SS control) mostraron significativamente ( $p < 0,05$ ) menos inmunomarcación con Ac antisinaptofisina en relación al grupo Wistar (control no diabético), así como con respecto a los grupos tratados con NDGA +  $\omega 6$  y NDGA+  $\omega 3$  , o solo  $\omega 3$  ( $p < 0,05$ ) (Fig. 46).

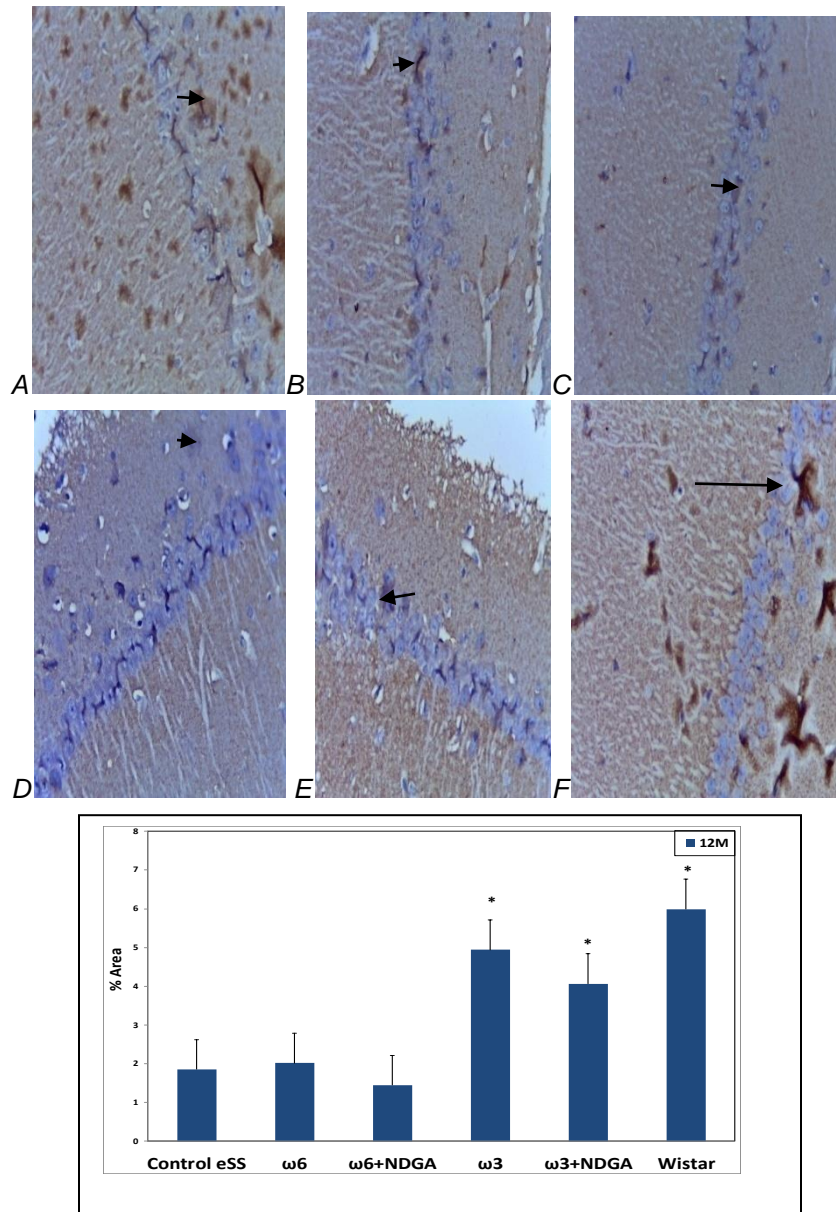


Fig. 47 Inmunomarcación Ac anti sinaptofisina ( $\rightarrow$ ) .Zona CA1 del Hipocampo A) Control e-SS (sintratamiento), B)  $\omega 6$ , C)  $\omega 6$ +NDGA, D)  $\omega 3$ , E)  $\omega 3$ +NDGA y

F) Wistar (control no diabético). Se utilizó el software Image J para realizar las mediciones. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* Indica diferencia significativa vs el control e-SS,  $p \leq 0.05$ .

## CAPITULO 5 DISCUSIÓN

La DBT2 es una enfermedad plurimetabólica, heterogénea, crónica ocasionada por la falta o utilización inadecuada de insulina, asociada a un proceso inflamatorio. Su etiopatogenia se asocia con glicolipototoxicidad, condición anormal en la cual la hiperglucemia y el exceso de ácidos grasos saturados libres se relacionan con la progresiva apoptosis de las células  $\beta$  (84,122), mientras que ciertos PUFAs parecen cumplir una función protectora (123), efecto que hemos observado en los resultados de esta Tesis. Las ratas e-SS, por desarrollar DBT2 asociada a la glicolipototoxicidad y complicaciones vinculadas a la misma, constituyen un modelo adecuado para estudiar el progresivo daño metabólico asociado con la ED, fenómeno no estudiado con anterioridad en este modelo (94-97). El hecho de que estos animales diabéticos no desarrollen hipertensión o ateromas, dos factores vasculares comunes en el desarrollo de la lesión cerebral, refuerza la etiología metabólica de la ED, independientemente que en el ser humano la hipertensión y la enfermedad vascular sean factores contribuyentes a la misma (124). Este mismo razonamiento se aplica para la ausencia de depósitos de amiloide, o la obesidad en las ratas e-SS. Por lo tanto, según los datos obtenidos en nuestro estudio, el daño cerebral se debería principalmente a DBT2 y a los trastornos metabólicos o fenómenos asociados con el envejecimiento (125,126).

El propósito de esta tesis fue para comprender un poco más sobre el papel de ciertos PUFAs y su eventual utilidad en animales adultos, fundamentalmente en los que presentan DBT2 y ED resultados que podrían, eventualmente ser considerados en la clínica (125,126).

El estudio ponderal (Fig. 29) de los animales de los diversos grupos estudiados permitió observar que las crías de animales de madres diabéticas nacieron con más peso que aquellas de madre no diabéticas (Wistar). Ello estaría relacionado a la condición diabética materna y es observado con frecuencia en bebés de madres diabéticas (127). Durante el transcurso del estudio, esta diferencia desapareció y ya no se observaron diferencias significativas en etapas más avanzadas de la vida, así como tampoco con respecto al desarrollo de obesidad en ninguno de los grupos, condición que es frecuente en otros modelos animales (128) y pacientes (129). La importancia de la ausencia de obesidad en este modelo de DBT2 y en el contexto de este trabajo reside en que ello permite separar un factor fisiopatológico frecuente, como es la obesidad, en las complicaciones crónicas de la DBT2.

La hipertrigliceridemia es un hecho frecuente en los pacientes con DBT2 y está asociada con sus complicaciones. Constituye un hecho fisiopatogénico asociado a la progresiva muerte de las células  $\beta$  por apoptosis (130), lo cual lleva a una disminución de la insulinemia y el desarrollo de DBT2. Es importante remarcar que esta hipoinsulinemia coincide con la aparición de las complicaciones crónicas de la DBT2. En nuestro trabajo se observó que la hipertrigliceridemia (Fig.34) precedió al desarrollo de DBT2 (Fig. 32,33), fenómeno ya descrito por el grupo de Tarres y colaboradores (94-97) al igual que la disminución de la insulinemia

luego del 6<sup>o</sup> mes de edad. Ello se asocio con apoptosis de las células  $\beta$ , siendo así la causa probable de la DBT2 en estos animales (83,84). La hipertrigliceridemia es uno de los factores que aporta a la complejidad de la DBT2 cuyas complicaciones dependen no solo de la hiperglucemia, sino también del trastorno en el metabolismo de los lípidos. Esta observación coincide con la experiencia clínica en la cual es frecuente observar que la hipertrigliceridemia crónica afecta desfavorablemente la historia natural de la DBT2 (131-133).

Observamos que el aporte de  $\omega$ 3 PUFAs con y sin NDGA se asoció a una disminución los valores de los TG plasmáticos en las ratas diabéticas a los 12 meses de edad, lo cual estaría relacionado con una mejoría en los parámetros conductuales, disminución de la ISBG, del estrés oxidativo, apoptosis y daño tisular, observados estos últimos en los preparados teñidos con H-E y Nissl y técnicas de citometría de flujo y TUNEL y mayor expresión de sinaptofisina. Los hallazgos descritos estarían asociados a la modulación del mecanismo de lipotoxicidad, el cual a través de la activación de la vía celular de ciertas proteínas mal plegadas, como es la frecuente la afectación en los pacientes diabéticos de la proteína interactiva thioredoxin (Txnip), miembro de la superfamilia, que regula la acción de las proteínas disulfido isomerasas claves en la respuesta de la señal de las proteínas mal plegadas (UPR) desencadenada entre otros factores por el exceso de nutrientes que lleva a estrés del retículo endoplásmico, inflamación, estrés oxidativo y apoptosis (134,135). A ello se suma la disregulación de moléculas claves en el control de los procesos metabólicos, como son: la proteína reguladora vinculante al esteroil (SREBP)-1c, receptor farnesoid X (FXR), proteínas "forkhead" O (FoxO) 1, ubiquitin C-terminal hidrolasa L (UCHL) 1, gen regulatorio N-myc (NDRG) 2, familia de proteínas perilipinas, la proteína reguladora 1 (Sirt1), polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) y gerlina (136).

El estudio de los AG mediante CG (Tabla 2) permitió observar un incremento de los PUFAs 18:2n6 y 18:3n6 y una disminución de los PUFAs 22:6n3 y 22:5n3 en los animales diabéticos no tratados, comparado con las ratas Wistar cuyo perfil de AG es considerado el patrón "normal". Estos hechos estarían corroborando el bloqueo parcial de las enzimas  $\Delta$  6 y  $\Delta$  5 desaturasas, como observaron Demcakova E y col. (137). Las perturbaciones metabólicas en la desaturación de los PUFAs, descrita en la condición diabética en general y en las ratas e-SS, en particular ha sido vinculada, con el síndrome metabólico y su consecuente estado inflamatorio crónico (138). En los animales tratados por vía IP con el aporte de AG solos o con el agregado de NDGA se pudo observar un incremento en los PUFAs 22:6n3 y 22:5n3, especialmente en el grupo tratado con  $\omega$ 3+NDGA (Tabla 2). Así, en los animales diabéticos tratados con aceite de pescado, rico en EPA y DHA encontramos valores de PUFAs más semejantes al grupo Wistar. Estos resultados y respuestas abren interesantes interrogantes para futuras investigaciones: ¿el efecto beneficioso fue debido solo al aporte directo, por vía IP de los PUFAs de larga cadena, "saltándose el impedimento del bloqueo parcial de la  $\Delta$  5, o  $\Delta$  6? ¿porqué fueron más eficientes, en lo que a la condición de diabetes se refiere los  $\omega$ 3 EPA y DHA? ¿porqué fue casi nulo y en algunos parámetros hasta casi contraproducente el aporte de  $\omega$ 6 AA?. ¿Cómo y porqué sucede el efecto sinérgico y beneficioso del aporte de  $\omega$ 3, junto con el compuesto antiinflamatorio



NDGA?. El campo de estudio que así se abre es muy estimulante para continuar investigando la DBT2 en este modelo, las ratas e-SS.

Se observó en las ratas e-SS un incremento progresivo en los valores de la glucemia y la HbA1c hasta llegar a los seis meses de edad a valores compatibles con los observados en la DBT2, que se mantuvieron moderadamente elevados hasta finalizar la experiencia, como lo observaron Tarres y col (94-97). No se observó modificación significativa de estos valores con el aporte de PUFAs y/o NDGA. Entonces, si bien en el grupo tratado con  $\omega$ 3, solo o con el agregado de NDGA, hubo mejorías en la conducta, imágenes tomográficas, ISBG, estrés oxidativo y daño celular, no pareció deberse, en nuestras condiciones experimentales a un efecto sobre la glucemia, sino a otros mecanismos que no pudimos precisar según el grado de profundización del presente trabajo. Sin embargo podemos proponer que estaría asociado multicausalmente a una disminución de los TG, de la inflamación y del el estrés oxidativo presentes como ya se conoce, en el fenómeno de la glicolipototoxicidad asociada a DBT2 (54,84).

El estudio de la conducta animal mediante el "Hole Board Test" (Fig. 30) permitió evaluar la conducta de búsqueda y escape, asociada con el desarrollo de la memoria visuoespacial y comprensión del espacio, relacionado a la función del hipocampo (107,108). En las pruebas realizadas al sexto mes de edad las ratas diabéticas (e-SS), mostraron mayor deterioro en las tres pruebas del "Hole Board Test" con respecto a los animales no diabéticos (Wistar) ampliando y corroborando las observaciones de Francis y col (106). La hipermotilidad observada por nosotros estaría relacionada con la la hiperfagia, que induciría una mayor conducta exploratoria y de búsqueda. Al año de edad se pudo observar en todos los animales una disminución en el puntaje del estudio del "Hole Board Test", es decir, menos movilidad y búsqueda. Ello fue más evidente en el grupo diabético sin tratamiento. Los animales tratados con  $\omega$ 3 u  $\omega$ 6 + NDGA u  $\omega$ 3 solamente mostraron valores intermedios (Fig. 30). Estas observaciones pueden vincularse al hipocampo, donde se asocian las aferencias sensoriales mediante mecanismos sinápticos y participa en las conductas de búsqueda y orientación subyacentes al aprendizaje, la memoria visuoespacial y de trabajo. A su vez, el hipocampo, por enlaces y sinapsis en la corteza entorrinal, participa en funciones motoras, motivacionales y emocionales complejas (139). El asta de Amón del hipocampo es sensible a diferentes noxas, como la inflamación crónica, el estrés oxidativo, en especial, en la zona CA1 donde registramos lesiones que se traducirían en perturbaciones conductuales como las descriptas.

En el estudio imagenológico realizado *in vivo* con TAC (Fig. 31) se observaron alteraciones en la tomografía, lesiones que se pueden asociar a imágenes de leucoararosis, comparables con los datos obtenidos por el grupo de Utrecht Diabetic Encephalopathy Study en pacientes diabéticos (109), o a lesiones de la sustancia blanca (WMLS), que señalan un sustrato anatómico dañado en la DBT2 (11,106,140). Debemos mencionar, como otra limitación de este estudio, el relativo pequeño volumen del cerebro de las ratas y el hecho que los equipos utilizados están calibrados para pacientes. Esto determina condicionantes en la comparación pero, a pesar de ello, pudimos obtener datos no cruentos y valiosos del cerebro en este modelo. Así, el análisis de las imágenes se pudo observar que los animales tratados con aceite de pescado, rico en EPA y DHA y en aquellos a los que se les

adicionó NDGA , tuvieron menos lesiones tomográficas que los animales no tratados, o que recibieron  $\omega 6$  solamente. El grupo Wistar, que constituyó el modelo imagenológico del patrón normal no mostró alteraciones tomográficas a los 12 meses de edad.

El estudio histopatológico con H-E y Nissl del tejido cerebral se focalizó en el hipocampo y la sustancia blanca. A nivel de la sustancia blanca (Fig.41) se observó espongirosis, siendo más evidente en el grupo e-SS control y menos notable en el grupo tratado con aceite de pescado + NDGA y ninguna relevante en el grupo control Wistar. A nivel del hipocampo, especialmente en la zona CA1 o sector Sommers de la capa piramidal, se observó dispersión del neuropilo y celular, adelgazamiento y vacuolización citoplasmática, siendo más evidente en el grupo e-SS control y menos significativa en el grupo tratado con aceite de pescado + NDGA, no observándose lesiones en grupo Wistar (Fig. 42, 43 y 44 ). Hallazgos similares también se presentaron en el giro dentado del hipocampo (Fig. 45). Nuestras observaciones son compatibles a los hallazgos previos sobre ED en animales y pacientes (125,126) así como en el estudio de Amin y col (111). Estos últimos autores observaron daño en hipocampo asociado a cambios conductuales en ratas, en las que se generó DBT2 mediante una dieta alta en grasa saturadas (111).

Los circuitos del cerebro humano se componen de más de un billón de neuronas y de un cuatrillón de sinapsis, en cuya plástica y permanente conectividad subyace, aparentemente, toda percepción humana, emoción, pensamiento y conducta (115). Los estudios experimentales en una variedad de especies han revelado que la estructura general del SNC se desarrolla sobre bases genéticas. Sin embargo los circuitos neuronales están expuestos a fenómenos de neuroplasticidad constantes relacionados con factores medioambientales como los que ocurren en la DBT2 especialmente por la glicolipototoxicidad, cuya etiopatogenia se esquematiza en la (Fig.48). La observación de dispersión celular en la capa piramidal de la zona CA1, podría corresponder a perturbaciones de las uniones sinápticas. Para ahondar en esta hipótesis realizamos un estudio con Ac antisinaptofisina, siguiendo el protocolo de Wang Jian-Qin y col. (141). Observamos, alteraciones en la expresión de esta proteína en el Asta de Amón de los animales diabéticos (Fig.46) pero , no en los animales sanos (Wistar). Es interesante que los grupos tratados con  $\omega 3$  solo, o asociado con NDGA presentaron valores semejantes al grupo control sano (Wistar). Tal observación evidenciaría daños en las sinapsis en la ED de las ratas e-SS, así como el efecto favorable del aceite pescado rico en EPA y DHA, con o sin el agregado del antiinflamatorio NDGA, en la protección sináptica ligado a el incremento en la expresión de la proteína sinaptofisina, fundamental en la sinapsis neuronal (142). La expresión de sinaptofisina se incrementaría con la ingesta de PUFAs especialmente de  $\omega 3$ , como lo mostraron recientemente Hajjar y col. (143). Comprender la utilidad y mecanismo de acción de los PUFAs permitirá a quienes trabajan en la atención de personas diabéticas tener una posibilidad más en los recurso terapéuticos en la ED.

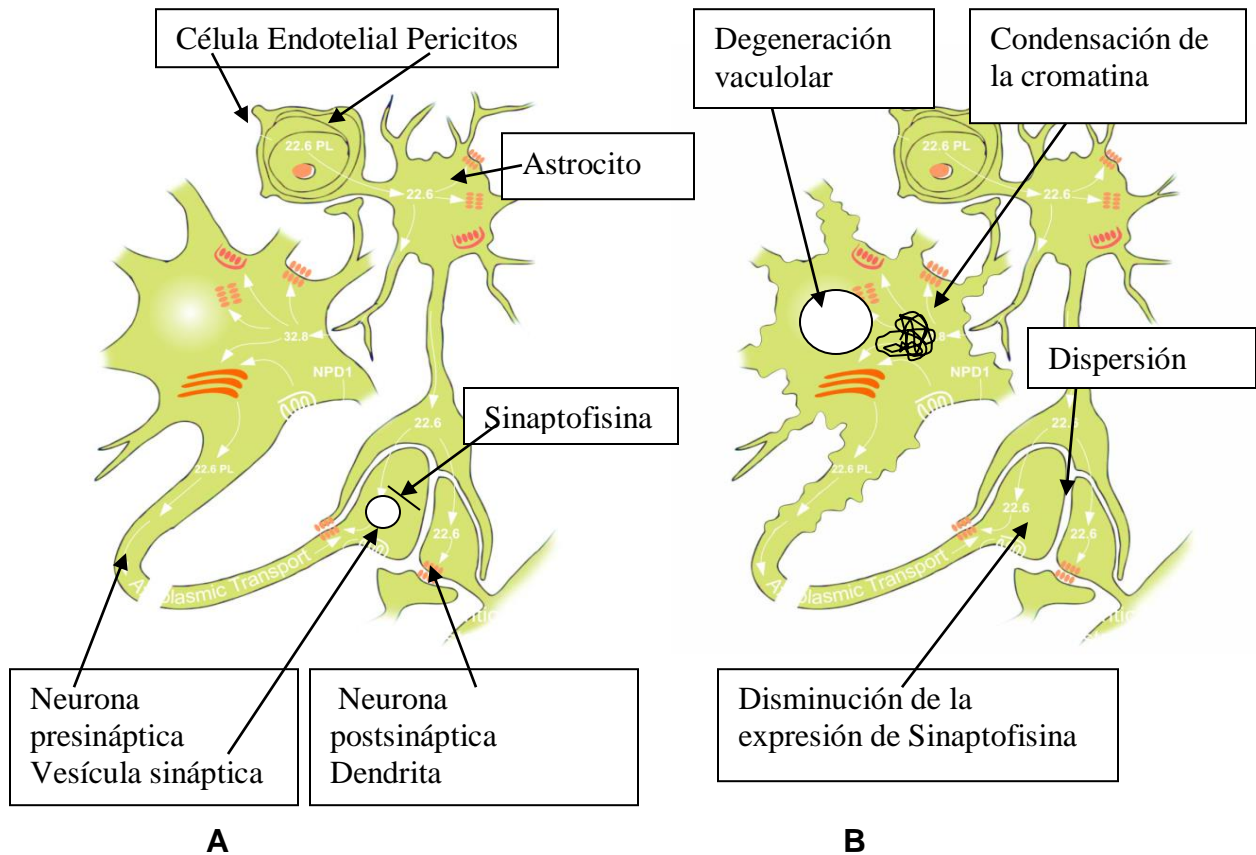


Fig. 48 Esquema de una Unidad Neurovascular donde se observa la relación entre el capilar, el astrocito y la sinapsis tripartita. **A** neurona de rata Wistar (no diabética) **B** neurona rata e-SS (diabética sin tratamiento) modificada de Bazan N G y col.(144).

Los hallazgos histológicos en los preparados del hipocampo teñidos con H-E y Nissl mostraron la presencia de apoptosis. Entonces, se recurrió a las técnicas de citometría de flujo y TUNEL (Fig. 39,40) a fin de cuantificar la presencia de apoptosis en el hipocampo. Observamos que el aporte de  $\omega 3$  con y sin NDGA en las ratas diabéticas protegió en algún grado a las células del hipocampo del deterioro por apoptosis asociado a DBT al compararla con las ratas diabéticas sin tratamiento. Estas observaciones coinciden con los hallazgos de Zhao y col.(90) quienes mostraron en un modelo de ED de ratas diabéticas inducida por estreptozotocina un incremento de la expresión de Bax y caspasa-3, que causó la apoptosis de neuronas piramidales CA1 y contribuyó aún más a los déficits en el aprendizaje y la memoria (90). Cabe remarcar que en la investigación de Zhao y col. se empleó estreptozotocina para inducir la diabetes experimental. Esta droga produce la muerte masiva, abrupta y total de las células  $\beta$  pancreáticas (90). La DBT así lograda experimentalmente se asemeja más a una DBT1. Por el contrario, en nuestro modelo de DBT la condición patológica es espontánea, aparecen progresivamente, la pérdida de células  $\beta$  y el daño pancreático y se agravan con la edad del animal (94-97) por lo que se asemeja a la DBT2 de los pacientes tal como fuera propuesto por Tarres y col (94-97). Es ésta la variedad de DBT que

constituye la mayor preocupación a nivel universal, por sus característica de pandemia y afectación plurimetabólica. Este trabajo aporta datos originales y pertinentes a esta problemática. Nuestros resultados explican parcialmente el mecanismo de las complicaciones crónicas en la DBT2 y aportamos resultados sobre porqué el tratamiento con aceite de pescado y el antiinflamatorio NDGA tienen efecto neuroprotector .

Observamos un incremento de fenómenos inflamatorios sistémicos en los animales diabéticos comparados con las ratas control no diabético (Wistar). Comprobamos que los parámetros inflamatorios estaban menos alterados en las ratas tratadas con aceite de pescado, especialmente aquellos que además recibieron NDGA. Estos resultados se pueden revisar en las figuras de PCR ultrasensible (Fig. 35), e IL-6 en plasma e hipocampo (Fig. 36). Estos hallazgos permiten asociar la relación entre lesión cerebral e inflamación crónica, fenómeno que se observa en procesos neurodegenerativos del SNC, como los descritos por Solfrizzi en el envejecimiento humano (145) y por Olsson y col. en una revisión de la etiopatogenia de los procesos neurodegenerativos más frecuentes (146). Uno de los efectos protectivos del aceite de pescado sumado al NDGA, podría deberse a la capacidad de los PUFAs  $\omega 3$  a ligarse y estimular la acción de los receptores nucleares citoplasmáticos proliferadores de peroxisomas (PPAR) , del receptor X del hígado y del receptor de ácido retinoico (RAR $\gamma$ ), que actúan sobre la expresión génica de la desaturasa estearoil CoA (SCD) y la FA desaturasa -1 y -2 (FASDS1 y 2) (145). En conjunto, contrapesarían el bloqueo de las enzimas desaturantes  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  que sucede en la DBT2 (12,13, 137).

Nuestros resultados sobre los ensayos realizados para estudiar el estrés oxidativo como mecanismo fisiopatogénico asociado a la glicolipotoxicidad e inflamación permitió observár en los animales e-SS no tratados o que recibieron  $\omega 6$  una elevación de los valores de marcadores del estrés oxidativo, como ser la enzima GGTP en plasma y cerebro (Fig. 37). Esta enzima también suele incrementarse en la DBT2 debido a esteatosis o esteatohepatitis. Pero ello no se observó en este trabajo, como tampoco la elevación de las transaminasas GOT y GPT. Observamos, a su vez, el incremento en marcadores de estrés oxidativo como son los lipoperóxidos (Fig. 38,A) e hidroperóxidos (Fig. 38,B). Valores, que fueron estadísticamente menores en los grupos que recibieron aceite pescado solo, o con NDGA y en el grupo control no diabético (Wistar). El estrés oxidativo es el mecanismo fisiopatológico más importante y frecuente asociado a las complicaciones crónicas en la DBT2 en humanos (148) y animales de experimentación (149), incluso en el estado prediabético (150). Nuestras observaciones estarían relacionadas con la acción antioxidante de los PUFAs,  $\omega 3$  y del NDGA, que se asocian en su efecto neuroprotector a la acción de los PUFAS  $\omega 3$  pues aumentan constantemente los niveles de neurotprotectina D1 (151).

Como un hallazgo adicional, surgido del desarrollo de esta Tesis, que abre interesantes perspectivas de estudios futuros fue la sobrevida comparativa de los animales en los diversos grupos. En este marco registramos el impacto del tratamiento con aceite pescado y  $\omega 6$  solos o con el agragado de NDGA en la sobrevida a 35 meses, ya que existen datos bibliográficos asociados al aporte de PUFAs y mortalidad. En un estudio epidemiológico Bell y col, ( 70.495

participantes) con edades entre 50 a 70 años al inicio del trabajo (2000-2002) que fueron seguidos hasta el año 2006 se observaron, 3.051, fallecimientos y que un mayor consumo de EPA y DHA de la dieta se asoció con un menor riesgo de mortalidad total (*hazard ratio* (HR) = 0,82, 95% intervalo de confianza (IC): 0,73 a 0,93) y por cáncer (HR = IC: 0,77; 95%: 0,64; 0,92), pero sólo registraron una pequeña reducción de muerte por enfermedad cardiovascular (HR = 0,87 IC del 95%: 0,68, 1,10) (152). Molfino y col., en una revisión sobre la utilidad de los PUFAs en ancianos observaron que los  $\omega$ 3 PUFAs son capaces de modular favorablemente la inflamación, la hiperlipidemia, la agregación plaquetaria y la hipertensión. Concluyeron que estos PUFA  $\omega$ 3 podrían tener importantes beneficios en la reducción del riesgo de deterioro cognitivo, frecuente en las personas mayores (153). Así, en el seguimiento sistemático, durante treinta y cinco meses de los restantes animales que no fueron sacrificados para otros estudios (Fig. 47), observamos una mayor longevidad en el grupo que recibió  $\omega$ 3, con y sin NDGA, seguido por el grupo tratado con  $\omega$ 6. Estos hallazgos podrían estar relacionados con un mejor control metabólico e inflamatorio sistémico.

Finalmente, podemos remarcar que se pudo trasladar las observaciones realizadas en pacientes diabéticos adultos mayores con DBT2 de larga evolución que presentaron ED comparándolas en la medida de lo posible con un modelo murino que reprodujo parcialmente esos hallazgos (ver Apéndice3). De esta manera hemos aportado nuevas evidencias que apoyan la hipótesis de esta Tesis de que las ratas e-SS desarrollan al año de edad un cuadro compatible con ED, cuyo mecanismo fisiopatológico se asocia a la glipotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo. Asimismo, hemos mostrado resultados originales, indicativos que la ED puede retardarse y aún aliviarse con el aporte de PUFAS  $\omega$ 3 pero no con  $\omega$ 6 con o sin el aporte de un antiinflamatorio natural como es el NDGA ( ver Apéndice 2).

## CAPITULO 6 CONCLUSIONES

En base a las Hipotesis y objetivos planteados a partir de los resultados obtenidos surgen las siguientes conclusiones:

- 1- Los hallazgos neurocognitivos, morfológicos y moleculares en este modelo (rata e-SS) son compatibles con ED
- 2- La fisiopatología se asocia con marcadores de glicolipototoxicidad, inflamación y marcadores de estrés oxidativo.
- 3- Los animales tratados con  $\omega$ 3 junto NDGA mostraron una mejora de estos parámetros, acercándose a los valores observados en los controles sanos (Wistar), mostrando que los  $\omega$ 3 PUFAs junto con el antiinflamatorio NDGA protegen el cerebro en los animales diabéticos abriendo un camino para tratar la ED. Estos efectos beneficiosos observados en nuestro modelo y en las condiciones experimentales empleadas, no fue logrado con la adición del  $\omega$ 6-AA.

Como implicancias traslacionales de este trabajo, el autor de esta tesis, junto a su director y miembros de la Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas -UNC e investigadores del INICSA donde se realizó este trabajo, trasladaron los conocimientos adquiridos al "Programa Aprendiendo a Vivir" que se lleva a cabo en la sede de la Fundación Grupo de Amigos de los Diabéticos de Villa Carlos Paz y en los tres años de desarrollo, generó un espacio de educación, contención, empoderamiento y aplicación de técnicas de actividad física desarrolladas para la preservación de las actividades psicomotoras.

## CAPITULO 7 GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico  
Ac: Anticuerpo  
AG : Ácidos grasos  
AGE: Ácidos grasos esenciales  
AGL: Ácidos grasos libres  
AGS:Ácidos grasos saturados  
ALA: Ácido  $\alpha$ -linolénico  
AL: Ácido alfa linoleico  
ALD: Adrenoleucodistrofia  
AE: Ácido eicosapentanoico  
AKT: Proteinkinasa B  
Col:Colesterol  
CG: Cromatografía de gases  
DHA: Ácido docosahexaenoico  
EPA: Ácido eicosanopentanoico  
HETES: Ácidos hidroxí-eicosatetraenoicos  
Fig: Figura  
DBT1: Diabetes mellitus tipo 1  
DBT2: Diabetes mellitus tipo 2  
DC: Deterioro cognitivo  
EA: Enfermedad de Alzheimer  
ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles  
ED: Encefalopatía diabética  
ERE: Estrés del retículo endoplásmico  
eSS : Ratas espontáneamente diabéticas Stillman Salgado  
FAME: Esteres metílicos  
FCM: Facultad de Ciencias Médicas  
FL: Fosfolípidos  
GPCRs: Proteínas acopladas a los receptores G  
HbA1c: Hemoglobina A glicosilada  
HyE:Hematoxilina y eosina  
HPLC: Cromatografía líquida  
IBC: Instituto de Biología Celular  
iNKT : Células invariantes NKT  
INICSA: Instituto Nacional de Ciencias de la Salud  
IP: Intraperitoneal  
IP<sub>3</sub>: inositol-tri3fosfato  
IR: Resistencia a la Insulina  
IRS2: Insulin receptor substrate 2  
ISBG: Inflamación sistémica de bajo grado  
LPS: Lipopolisacáridos  
LT: Leucotrienos

LTB4: Leucotrieno B4  
MO: Microscopía óptica  
MET: Microscopía electrónica de transmisión  
NDGA: Ácido nordehidroguaiarético  
NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas  
NO: Óxido Nítrico  
NKT: Linfocitos T asesinos por naturaleza  
PCR: Proteína C Reactiva Ultrasensible  
PD: Enfermedad de Parkinson  
PGs: Prostaglandinas  
PGIs: Prostaciclina  
PH: Prueba del hueso  
PI 3K :Fosfoinositol 3 kinasa  
PIP2: Fosfoinositol difosfato  
PUFAs : Ácidos grasos poliinsaturados  
PPAR: Receptores activadores de los peroxisomas  
PTOG: Prueba de tolerancia oral a la glucosa  
RE: Retículo endoplásmico  
RIns: receptor de insulina  
SM: Síndrome Metabólico  
SNC: Sistema Nervioso Central  
TG: Triglicéridos  
TXs: Tromboxanos  
Tx A2: Tromboxano A2  
UNC: Universidad Nacional de Córdoba  
UNR: Universidad Nacional de Rosario  
VCAM: Proteína de adhesión celular vascular  
vs: versus



## CAPITULO 9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Wild S, Roglic G, Green A, and King H. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27:1047-1053.
- 2.- Christopher T. Kodl and Elizabeth R. Seaquist Cognitive Dysfunction and Diabetes Mellitus *Endocrine Reviews* 2008; 29 : 494-511
- 3.- Keen H and Mattock MB Complications of Diabetes Mellitus: Role of Essential Fatty Acids Chap 34 pag 447-4-55 Horrobin D. F.Omega-6 Essential Fatty Acids Pathophysiology and roles in Clinical Medicine Wiley-Liss New York 1990
- 4.- Eynard AR Potential of essential fatty acids as natural therapeutic products for human tumors. *Nutrition*. 2003 ; 19 :386-8
- 5.- Pasqualini ME, Mohn CE, Petiti JP, Manzo P, Eynard AR. COX and LOX eicosanoids modulate platelet activation and procoagulation induced by two murine cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000;63: 377-83.
- 6.- Blanco A Química Biológica Cap 14 251-283. Ed El Ateneo Buenos Aires 2006
- 7.- Eynard AR, Lopez CB. Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer. *Lipids Health Dis*. 2003 29;2:6.
- 8.- Eynard A R, Valentich M.A. y Rovasio R.A. Histología y Embriología del ser Humano. Ed Panamericana Buenos Aires 5 Edición ,en prensa 2015.
- 9.- Gerrit van Meer, Dennis R. Voelker, and Gerald W. Feigenson Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 ; 9: 112–124.
- 10.- Latour A, Grintal B, Champeil-Potokar G, Hennebelle M, Laviaille M, Dutar P, Potier B, Billard J, Vancassel S, Denis I Omega-3 fatty acids deficiency aggravates glutamatergic synapse and astroglial aging in the rat hippocampal CA1. *Aging Cell*. 2013 ;12:76-84.
- 11.- Lee J H, Yera Choi, Jun Ch, Hong Y S, Cho H B, Kim J E, and Lyoo I K Neurocognitive Changes and Their Neural Correlates in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus *Endocrinol Metab*. 2014; 29 (2): 112–121.
- 12.- Brenner RR, Omar J. Rimoldi, Yolanda B. Lombardo, María S. González, Ana M. Bernasconi, Adriana Chicco, Juan C. Basabe Desaturase activities in rat model of insulin resistance induced by a sucrose-rich diet. *Lipids* 2003; 38:733-742
- 13.- Brenner RR. Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003; 68:151-62.
- 14.- Das UN. Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how?. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000 ;63:351-62.
- 15.- Singh RB, Gupta S, Dherange P, De Meester F, Wilczynska A, Alam SE, Pella D, Wilson DW. Metabolic syndrome: a brain disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 ; 9: 1171-83.

- 16.- Walczewska A, Stępień T, Bewicz-Binkowska D, Zgórzyńska E The role of docosahexaenoic acid in neuronal function *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2011 ;65:314-27.
- 17.- Champeil-Potokar G, Denis I, Goustard-Langelier B, Alessandri JM, Guesnet P, Lavielle M Astrocytes in culture require docosahexaenoic acid to restore the n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid balance in their membrane phospholipids. *J Neurosci Res* 2004 ;75:96-106.
- 18.- Bazan NG. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol*. 2005 ;15:159-66.
- 19.- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW., Jr Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796–808.
- 20.- Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:219–46.
- 21.- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365:1333–46.
- 22.- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:85–96.
- 23.- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- $\alpha$  in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem*. 2001; 276:47944–9.
- 24.- Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21:589–98.
- 25.- Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE*. 2005; 2005:pe4.
- 26.- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*. 2002; 360:57–8.
- 27.- Brooks GC, Blaha MJ, Blumenthal RS. Relation of C-reactive protein to abdominal adiposity. *Am J Cardiol*. 2010;106:56–61.
- 28.- Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 2008;118:2992–3002.
- 29.- Daar AS, Singer PA, Persad DL, et al. Grand challenges in chronic non-communicable diseases. *Nature*. 2007;450 :494–496.
- 30.- Wu L., Parekh V.V., Gabriel C.L., Bracy D.P., Marks-Shulman P.A., Tamboli R.A., Kim S., Mendez-Fernandez Y.V., Besra G.S., Jefferson P. Lomenick J.P., Williams B., Wasserman D.H., and Van Kaer L. Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 ; 109: E1143–E1152.
- 31.- Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2005;98:1154–1162.

- 32.- Eynard AR, Navarro A. Crosstalk among dietary polyunsaturated fatty acids, urolithiasis, chronic inflammation, and urinary tract tumor risk. *Nutrition*. 2013 ;29:930-8.
- 33.- Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 2008;118:2992–3002
- 34.- Winer S, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009;15:921–929.
- 35.- Feuerer M, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009;15:930–939.
- 36.- Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297–336.
- 37.- Lynch L, et al. Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *Eur J Immunol*. 2009;39:1893–1901.
- 38.- Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: What's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004;4:231–237.
- 39.- Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:354–364.
- 40.- Schipper HS, Rakhshandehroo M, van de Graaf SF, Venken K, Koppen A, Stienstra R, Prop S, Meerding J, Hamers N, Besra G, Boon L, Nieuwenhuis EE, Elewaut D, Prakken B, Kersten S, Boes M, Kalkhoven E. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. *J Clin Invest*. 2012 4;122:3343-54.
- 41.- Kalupahana N S, Claycombe K J, and Moustaid-Moussa N (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights. *Adv Nutr*. 2011; 2: 304–316
- 42.- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120:1640–5.
- 43.- Chapkin RS, Kim W, Lupton JR, McMurray DN. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009; 81:187–91.
- 44.- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106:2747–57.
- 45.- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115:1111–9.
- 46.- Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol*. 2008;216:3–13.
- 47.- Harkins JM, Moustaid-Moussa N, Chung YJ, Penner KM, Pestka JJ, North CM, Claycombe KJ. Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3–L1 cells and C57BL/6J and ob/ob mice. *J Nutr*. 2004;134:2673–7.

- 48.- Zhou HR, Kim EK, Kim H, Claycombe KJ. Obesity-associated mouse adipose stem cell secretion of monocyte chemotactic protein-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293:E1153–8.
- 49.- Magne J, Mariotti F, Fischer R, Mathe V, Tome D, Huneau JF. Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue. *J Nutr Biochem.* 2010;21:550–5.
- 50.- Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* 2011;17:179–88.
- 51.- DeFuria J, Bennett G, Strissel KJ, Perfield JW II, Milbury PE, Greenberg AS, Obin MS. Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *J Nutr.* 2009;139:1510–6.
- 52.- Das UN. Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition.* 2010; 5:459-73
- 53.- Lopez CB, Barotto NN, Valentich MA, Eynard AR. "Morphological and biological characterization of two mesenchymal murine tumors and the modulation of their growth parameters by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids" *prost.Leuk.Essent. Fatty Acids* 59:3412-,1998.
- 54.- Briaud I, Harmon J S, Kelpel C L, Babu G and Poitout V Lipotoxicity of the Pancreatic  $\beta$ -Cell Is Associated With Glucose-Dependent Esterification of Fatty Acids Into Neutral Lipids. *Diabetes* 2001; 50:315-321
- 55.- Farooqui AA. n-3 fatty acid-derived lipid mediators in the brain: new weapons against oxidative stress and inflammation. *Curr Med Chem.* 2012;4:532-43.
- 56.- Zhao Y, Calon F, Julien C, Winkler JW, Petasis NA, Lukiw WJ, Bazan NG Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPAR $\gamma$ -mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. *PLoS One.* 2011 ;6:e15816.
- 57.- Notarnicola M, Messa C, Refolo MG, Tutino V, Miccolis A, Caruso MG Polyunsaturated fatty acids reduce fatty acid synthase and hydroxyl-methyl-glutaryl CoA-reductase gene expression and promote apoptosis in HepG2 cell line. *Lipids Health Dis.* 2011; 18:10:10.
- 58.- Comba A, Maestri DM, Berra MA, Garcia CP, Das UN, Eynard AR, Pasqualini ME. Effect of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipids Health Dis.* 2010 ;9:112.
- 59.- Das UN. Can essential fatty acids reduce the burden of disease(s)? *Lipids in Health and Disease* 2008, 7:9
- 60.- Díaz-Gerevini GT, Repossi G, Dain A, Tarres MC, Das UN, Eynard AR Cognitive and motor perturbations in elderly with longstanding diabetes mellitus. *Nutrition* 2014, 628–635
- 61.- Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233:674–88.
- 62.- Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol.* 2011 ;44(2):203-15.

- 63.- Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front Physiol.* 2015 ; 8;6:109.
- 64.- Couet C, Delarue J, Ritz P, Antoine JM, Lamisse F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997;21:637–43.
- 65.- Danielle Swanson, Robert Block, and Shaker A. Mousa Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life *Adv Nutr.* 2012 ; 3: 1–7.
- 66.- van Schothorst EM, Flachs P, Franssen-van Hal NL, Kuda O, Bunschoten A, Molthoff J, Vink C, Hooiveld GJ, Kopecky J, et al. Induction of lipid oxidation by polyunsaturated fatty acids of marine origin in small intestine of mice fed a high-fat diet. *BMC Genomics.* 2009;10:110.
- 67.- Guo W, Xie W, Lei T, Hamilton JA. Eicosapentaenoic acid, but not oleic acid, stimulates beta-oxidation in adipocytes. *Lipids.* 2005; 40:815–21.
- 68.- Wensaas AJ, Rustan AC, Just M, Berge RK, Drevon CA, Gaster M. Fatty acid incubation of myotubes from humans with type 2 diabetes leads to enhanced release of beta-oxidation products because of impaired fatty acid oxidation: effects of tetradecylthioacetic acid and eicosapentaenoic acid. *Diabetes.* 2009;58:527–35.
- 69.- Figueras M, Oliván M, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Effects of eicosapentaenoic Acid (EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: improvement of the inflammatory status. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19: 362–9.
- 70.- Krebs JD, Browning LM, McLean NK, Rothwell JL, Mishra GD, Moore CS, Jebb SA. Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. *Int J Obes (Lond).* 2006; 30:1535–44.
- 71.- Kuda O, Jelenik T, Jilkova Z, Flachs P, Rossmeisl M, Hensler M, Kazdova L, Ogston N, Baranowski M, et al. n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia.* 2009; 52:941–51.
- 72.- Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, Gillum M, Shulman GI. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes.* 2006; 55:924–8
- 73.-Elias MF, EliasPK, D’Agostino RB Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham heart study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:260-268
- 74.- Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, Morley JE. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 2004 53:1253–1260
- 75.-Rahul Agrawal and Fernando Gomez-Pinilla ‘Metabolic syndrome’ in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *The Journal of Physiology*, 2012; 590: 2485-2499
- 76.- Lister JP, Barnes CA. Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch Neurol.* 2009; 66:829–833.
- 77.- Godbout JP, Johnson RW. Interleukin-6 in the aging brain. *J Neuroimmunol.* 2004; 147:141–144.

- 78.- Landfield PW, Rose G, Sandles L, Wohlstadter TC, Lynch G. Patterns of astroglial hypertrophy and neuronal degeneration in the hippocampus of ages, memory-deficient rats. *J Gerontol.* 1977; 32:3–12.
- 79.- Kadish I, Thibault O, Blalock EM, Chen KC, Gant JC, et al. Hippocampal and cognitive aging across the lifespan: a bioenergetic shift precedes and increased cholesterol trafficking parallels memory impairment. *J Neurosci.* 2009; 29:1805–1816.
- 80.- Laye S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010; 82:295–303.
- 81.- Virginie F. Labrousse, Agnes Nadjar, Corinne Joffre, Laurence Costes, Agnès Aubert, Stéphane Grégoire, Lionel Bretillon, and Sophie Layé Short-Term Long Chain Omega3 Diet Protects from Neuroinflammatory Processes and Memory *PLoS One.* 2012;7: e36861.
- 82.- Yang RH, Wang F, Hou XH, Cao ZP, Wang B, Xu XN, Hu SJ. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids improves learning performance of diabetic rats by regulating the neuron excitability. *Neuroscience.* 2012 ;212: 93-103.
- 83.- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003; 52:102–110.
- 84.- Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev.* 2008; 29:351–366.
- 85.- Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2007; 50:752–763
- 86.- Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, et al. Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1. *PLoS ONE.* 2009;4:e4954.
- 87.- Li D, Yin X, Zmuda EJ, Wolford CC, Dong X, et al. The repression of IRS2 gene by ATF3, a stress-inducible gene, contributes to pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes.* 2008;57: 635–644.
- 88.- Martinez SC, Tanabe K, Cras-Meneur C, Abumrad NA, Bernal-Mizrachi E, et al. Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Diabetes.* 2008;57: 846–859.
- 89.- Antony R, Lukiw WJ, Bazan NG. Neuroprotectin D1 induces dephosphorylation of Bcl-xL in a PP2A-dependent manner during oxidative stress and promotes retinal pigment epithelial cell survival. *J Biol Chem.* 2010; 285:18301–18308.
- 90.- Zhao CH, Liu HQ, Cao R, Ji AL, Zhang L, Wang F, Effects of dietary fish oil on learning function and apoptosis of hippocampal pyramidal neurons in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res.* 2012 ; 1457:33-43.
- 91.- Perea G, Sur M, Araque A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Neuron-glia networks: integral gear of brain function. Front Cell Neurosci.* 2014 ; 6;8:378.
- 92.- Martinez G, Di Giacomo C, Carnazza ML, et al. MAP2, synaptophysin immunostaining in rat brain and behavioral modifications after cerebral postischemic reperfusion. *Dev Neurosci.* 1997;19:457–464

- 93.- Wang JQ, Yin J, Song YF, Zhang L, Ren YX, Wang DG, Gao LP, Jing YH. Brain aging and AD-like pathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Res.* 2014;796840.
- 94.- Gomez Dumm IN, Montenegro S, Tarrés MC, Martinez SM, Igal RA. Early lipid alterations in spontaneously diabetic rats. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 1998; 48:228-34
- 95.-Tarrés MC, Martinez SM, Montenegro S, Llorens A, Picena JC, Naves. The eSS rat. A model for non-insulin-dependent human diabetes. *Am J Pathol.* 1992 ,141:761-3
- 96.-Picena JC, Montenegro SM. *Medicina (B Aires)*. Dynamic modifications in islets of Langerhans in two lines of spontaneously diabetic rats. 2007;67:331-40
- 97.- Daniele SM, Montenegro SM, Tarres MC, Picena JC, Martinez SM. The eSS rat, a nonobese model of disordered glucose and lipid metabolism and fatty liver. *Diabetol Metab Syndr.* 2010; 17;2:15.
- 98.- Trépanier MO, Lim J, Lai TK, Cho HJ, Domenichiello AF, Chen CT, Taha AY, Bazinet RP, Burnham WM. Intraperitoneal administration of docosahexaenoic acid for 14 days increases serum unesterified DHA and seizure latency in the maximal pentylenetetrazol model. *Epilepsy Behav.* 2014 ;33:138-43.
- 99.- Prince E, Lazare FB, Treem WR, Xu J, Iqbal J, Pan X, Josekutty J, Walsh M, Anderson V, Hussain MM, Schwarz SM.  $\omega$ -3 Fatty Acids Prevent Hepatic Steatosis, Independent of PPAR- $\alpha$  Activity, in a Murine Model of Parenteral Nutrition-Associated Liver Disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2014 ;38:608-16.
- 100.- Comba A, Maestri DM, Berra MA, Garcia CP, Das UN, Eynard AR, Pasqualini ME. Effect of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipids Health Dis.* 2010; 8;9:112.
- 101.- Cremonezzi DC<sup>1</sup>, Silva RA, del Pilar Díaz M, Valentich MA, Eynard AR. Dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA) differentially modulate melamine-induced preneoplastic urothelial proliferation and apoptosis in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2001; 64:151-9.
- 102.- Comba A, Lin YH, Eynard AR, Valentich MA, Fernandez-Zapico ME, Pasqualini ME. Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors. *Cancer Metastasis Rev.* 2011 ; 30:325-42.
- 103.- File S.E., Wardill A.G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacology.* 1975; 44:53–59.
- 104.- Greenberg R. The role of neophobia and neophilia in the development of innovative behaviour of birds. In: Reader S.M., Laland K.N., editors. *Animal Innovation*. Cambridge University Press; Cambridge: 2003. pp. 175–196.
- 105.- Brown G R and Nemes C The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: is heading-dipping a valid measure of neophilia? *Behav Processes.* 2008 ; 78: 442–448.
- 106.- Toth C, Schmidt AM, Tuor UI, Francis G, Foniok T, Brussee V, Kaur J, Yan SF, Martinez JA, Barber PA, Buchan A, Zochodne DW. Diabetes, leukoencephalopathy and rage. *Neurobiol Dis.* 2006 ;23:445-61.

- 107.- Almaguer-Melian W, Bergado JA, López-Rojas J, Frey S, Frey JU. Differential effects of electrical stimulation patterns, motivational-behavioral stimuli and their order of application on functional plasticity processes within one input in the dentate gyrus of freely moving rats in vivo. *Neuroscience*. 2010; 165:1546-58.
- 108.-Lever C, Burton S, O'Keefe J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci*. 2006; 17:111-33.
- 109.- de Bresser J, Audrey M, Tiehuis A M , van den Berg E, Reijmer Y, Jongen C, Biessels G J, and on behalf of the Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group Progression of Cerebral Atrophy and White Matter Hyperintensities in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33:1309-1314
- 110.- Soria EA, Eynard AR, Quiroga PL, Bongiovanni GA. Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines. *Life Sci*. 2007 ;81:1397-402.
- 111.- Amin SN, Younan SM, Youssef MF, Rashed LA, Mohamady I. A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Res*. 2013 . 9;2:151. doi: 10.12688/f1000research.2-151.v1. eCollection 2013.
- 112.- Norwood B A, Bumanglag A V, Osculati F, Sbarbati A, Marzola P, Nicolato E, Fabene P F, and Sloviter R S. Classic hippocampal sclerosis and hippocampal-onset epilepsy produced by a single “cryptic” episode of focal hippocampal excitation in awake rats. *J Comp Neurol*. 2010 ; 518: 3381–3407.
- 113.- Anarkooli I J, Ganji H B , and Pourheidar M The Protective Effects of Insulin and Natural Honey against Hippocampal Cell Death in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Published online , 2014. doi: 10.1155/2014/491571
- 114.- Megan M. Garrity, B.S., Lawrence J. Burgart, M.D., Darren L. Riehle, B.A., C.T., Eunice M. Hill, B.S., C.T., Thomas J. Sebo, M.D., Ph.D., Thomas Witzig, M.D. Identifying and Quantifying Apoptosis: Navigating Technical Pitfalls . *Mod Pathol* 2003;16:389–394.
- 115.- Reichmann F, Painsipp E, Holzer P, Kummer D, Bock E, Leitinger G. A novel unbiased counting method for the quantification of synapses in the mouse brain. *J Neurosci Methods*. 2014; 3;240 C:13-21.
- 116.- Ba A, B V and HaN SH Thiamine administration during chronic alcohol intake in pregnant and lactating rats: effects on the offspring neurobehavioural development *Alcohol & Alcoholism.*;1996; 31:27-40.
- 117.- Warren JD, Schott JM, Fox NC, Thom M, Revesz T, Holton JL, Scaravilli F, Thomas DG, Plant GT, Rudge P, Rossor MN Brain biopsy in dementia. *Brain*. 2005 ;128:2016-25.
- 118.- Hajjar T, Meng Goh Y , Rajion MA , Vidyadaran S, Li TA , and Ebrahimi M Alterations in neuronal morphology and synaptophysin expression in the rat brain as a result of changes in dietary n-6: n-3 fatty acid ratios. *Lipids Health Dis*. 2013; 12: 113.
- 119.- Hylin MJ, Orsi SA, Zhao J, Bockhorst K, Perez A, Moore AN, Dash PKJ Neurotrauma. Behavioral and histopathological alterations resulting from mild fluid percussion injury. 2013; 30:702-15.



- 120.- Davies DC, Horwood N, Isaacs SL, Mann DM The effect of age and Alzheimer's disease on pyramidal neuron density in the individual fields of the hippocampal formation. *Acta Neuropathol.* 1992; 83:510-7.
- 121.- Xu J, Ma C, Han L, Gao H, Zhou Q, Yang M, Chen Ch, Deng Q, Huang Q, and Huang F Optimized rapeseed oils rich in endogenous micronutrients ameliorate risk factors of atherosclerosis in high fat diet fed rats *Lipids Health Dis.* 2014; 13: 166.
- 122.- Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on  $\beta$ -cell turnover and function. *Diabetes* 200150:69–76
- 123.- Wei D, Li J, Shen M, Jia W, Chen N, Chen T, Su D, Tian H, Zheng S, Dai Y, Zhao A . Cellular production of n-3 PUFAs and reduction of n-6-to-n-3 ratios in the pancreatic beta-cells and islets enhance insulin secretion and confer protection against cytokine-induced cell death. *Diabetes.* 2010 ; 59:471-8.
- 124.- Prasad S, Sajja RK, Naik P, Cucullo L. Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. *J Pharmacovigil.* 2014 ;2:125.
- 125.- Sima AA .Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol.* 2010 ;47:279-93.
- 126.-G.T. Díaz-Gerevini, G. Repossi, A. Dain, M.C. Tarres, U.N. Das, A.R. Eynard Cognitive and motor perturbations in elderly with longstanding diabetes mellitus. *Nutrition.* 2014; 30:628-35
- 127.- Yamashita H, Yasuhi I, Fukuda M, Kugishima Y, Yamauchi Y, Kuzume A, Hashimoto T, Sugimi S, Umezaki Y, Suga S, Kusuda N. The association between maternal insulin resistance in mid-pregnancy and neonatal birthweight in uncomplicated pregnancies. *Endocr J.* 2014;61:1019-24.
- 128.- Ueta K, O'Brien TP, McCoy GA, Kim K, Healey EC, Farmer TD, Donahue EP, Condren AB, Printz RL, Shiota M. Glucotoxicity targets hepatic glucokinase in Zucker diabetic fatty rats, a model of type 2 diabetes associated with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014 Jun 1;306:E1225-38.
- 129.- Ding D, Chong S, Jalaludin B, Comino E, Bauman AE. Risk factors of incident type 2-diabetes mellitus over a 3-year follow-up: Results from a large Australian sample. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015. 14. pii: S0168-8227.00099-6.
- 130.- Jiao J, Dou L, Li M, Lu Y, Guo HB, Man Y, Wang S, Li J. NADPH oxidase 2 plays a critical role in dysfunction and apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cells induced by very low-density lipoprotein. *Mol Cell Biochem.* 2012 ;370:103-13.
- 131.- Sharma RB, Alonso LC. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr Diab Rep.* 2014 ;14:492.
- 132.- Biden TJ, Boslem E, Chu KY, Sue N. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress,  $\beta$  cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 ;25:389-98.
- 133.- Cernea S, Dobreanu M Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. *Biochem Med .* 2013;23:266-80.
- 134.- Flamment M, Fougelle F. Endoplasmic reticulum stress: from physiology to pathogenesis of type 2 diabetes. *Med Sci .* 2013 ;29:756-64.
- 135.- Lee S, Min K S, Dotimas J, Li L, Feener E P, Baldus S, Myers R B, Chutkow WA, Patwari P, Yoshioka J, Lee RT. Thioredoxin-

interacting protein regulates protein disulfide isomerases and endoplasmic reticulum stress. *EMBO Mol Med.* 2014 ;6:732-43.

136.- Shao S, Yang Y, Yuan G, Zhang M, Yu X. Signaling molecules involved in lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *DNA Cell Biol.* 2013 ;32:41-9.

137.- Demcakova E, Sebokova, Ukropec J, Gasperikova D, Klimes I. Delta-6 desaturase activity and gene expression, tissue fatty acid profile and glucose turnover rate in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Endocr Regul.* 2001 Dec;35(4):179-86

138.- Das UN. A defect in  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  desaturases may be a factor in the initiation and progression of insulin resistance, the metabolic syndrome and ischemic heart disease in South Asians. *Lipids Health Dis.* 2010. 9;9:130.

139.- Bast T. Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior. *Rev Neurosci.* 2007;18:253-81.

140.- Barbera van Harten, Frank-Erik de Leeuw, Henry C. Weinstein, Philip Scheltens, and Geert Jan Biessels. Brain Imaging in Patients With Diabetes A systematic review. *Diabetes Care* November 2006. 2539-2548

141.- Wang J Q, Yin J, Song Y F, Zhang L, Ren Y X, Wang D G, Gao L P, and Jing Y H. Brain Aging and AD-Like Pathology in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats *J Diabetes Res.* 2014; 2014: 796840.

142.- Janz R, Sudhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron.* 1999 ;12:687–700

143.- Hajjar T, Goh Y M, Rajion M A, Vidyadaran S, Li T A , and Ebrahimi M. Alterations in neuronal morphology and synaptophysin expression in the rat brain as a result of changes in dietary n-6: n-3 fatty acid ratios. *Lipids Health Dis.* 2013; 26; 12:113.

144.- Bazan N G, Molina M F, and Gordon W C. Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition: Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration, Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases *Annu Rev Nutr.* 2011. 21; 31: 321–351.

145.- Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Torres F, Rizzo C. et al. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian longitudinal study on aging. *Neurobiol Aging.* 2006; 12:1694–1704.

146.- Olsson B, Zetterberg H, Hampel H, Blennow K. Biomarker-based dissection of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* 2011;95 :520-34.

147.- Gillies PJ, Bhatia SK, Belcher LA, Hannon DB, Thompson JT, Vanden Heuvel JP Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil. *J Lipid Res.* 2012 ;53 :1679-89

148.- Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013 ;93 :137-88.

149.- Molinar-Toribio E, Pérez-Jiménez J, Ramos-Romero S, Lluís L, Sánchez-Martos V, Taltavull N, Romeu M, Pazos M, Méndez L, Miranda A, Cascante M, Medina I, Torres JL. Cardiovascular Disease-Related Parameters and Oxidative Stress in SHROB Rats, a Model for Metabolic Syndrome. *PLoS One.* 2014. 12;9 :e104637.

- 150.-Pereira CS, Molz P, Palazzo RP, de Freitas TA, Maluf SW, Horta JA, Prá D, Franke SI. DNA damage and cytotoxicity in adult subjects with prediabetes. *Mutat Res.* 2013 15;753 :76-81.
- 151.- Bazan NG. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol.* 2005 ; 15 :159-66.
- 152.- Bell GA, Kantor ED, Lampe JW, Kristal AR, Heckbert SR, White E. Intake of long-chain  $\omega$ -3 fatty acids from diet and supplements in relation to mortality. *Am J Epidemiol.* 2014 ;15;179:710-20.
- 153 .- Molfino A, Gioia G, Rossi Fanelli F R, and Muscaritoli M. The Role for Dietary Omega-3 Fatty Acids Supplementation in Older Adults. *Nutrients.* 2014;6: 4058–4072.

## **APENDICE**

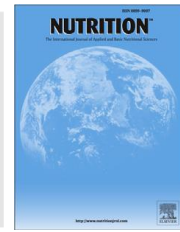
## APENDICE 1



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Nutrition

journal homepage: [www.nutritionjrn.com](http://www.nutritionjrn.com)



Review

### Cognitive and motor perturbations in elderly with longstanding diabetes mellitus

G.T. Díaz-Gerevini M.Sc. a, G. Repossì Ph.D. a,b,c, A. Dain M.D. a, M.C. Tarres Ph.D. c,d, U.N. Das M.D., F.A.M.S., F.R.S.C. e, f, A.R. Eynard Ph.D. a,c,\* Nutrition 30 (2014) 628–635

a Biología Celular, Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, INICSA (CONICET-Universidad Nacional de Córdoba), Córdoba, Argentina b Cátedra de Histología, Embriología y Genética, Universidad Nacional de La Rioja, La Rioja, Argentina

c CONICET, Argentina

d Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

e Department of Medicine, GVP Hospital and BioScience Research Centre, Campus of Gayatri Vidya Parishad College of Engineering, Visakhapatnam, India

f UND Life Sciences, Federal Way, Washington, USA

### a b s t r a c t

Type 2 diabetes mellitus is a chronic disease characterized by insulin resistance; inflammation; oxidative stress; vascular damage; and dysfunction of glucose, protein, and lipid metabolisms.

However, comparatively less attention has been paid to neurologic alterations seen in elderly individuals with type 2 diabetes. We review clinical, metabolic, and biochemical aspects of diabetic encephalopathy (DE) and propose that quality of dietary lipids is closely linked to DE. This implies that preventive nutritional interventions may be designed to improve DE.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved

### Keywords:

Diabetes mellitus

Insulin resistance

DE (Diabetic Encephalopathy)

Oxidative stress

Dietary lipids

## **Introduction**

Diabetes mellitus (DM) is a complex, chronic, systemic, metabolic disorder that can have deleterious effects on several target organs and systems such as the heart, eye, kidneys, vascular tissues, nervous system, and the brain. It is the leading cause of end-stage renal disease, loss of vision, neuropathy, and cardiovascular disease (CVD) [1,2]. Additionally, an increasing number of elderly individuals with DM exhibit cognitive impairment and motor dysfunctions that can cause postural balance impairment and features that together are known as diabetic encephalopathy (DE) [2–4]. The pathophysiology of DE could be attributed to long-standing hyperglycemia, elevated blood pressure, hyperinsulinemia, frequent and severe episodes of hypoglycemia, and dyslipidemia. These cardinal metabolic alterations are enhanced through phosphorylation of tau protein, favoring the formation of neurofibrillary tangles [5–7] and diminished amyloid breakdown caused by insulin-degrading enzyme deficiency [8–10] that, in turn, can result in the development of Alzheimer's disease (AD) [11]. Abnormal accumulation of advanced glycation end products (AGEs) in the brain, chronic and persistent systemic low-grade chronic inflammation (LGCI) [12], increased apoptosis resulting in neuronal loss [9,10,13,14] may result in accelerated brain aging [15,16]. The objective of this review is to discuss and summarize the pathophysiology of DE and to suggest how supplementation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) may prevent DE. This review was designed based on data collected from existing literature (obtained from PubMed), clinical experience, research results, and critical review of the literature based on its relevance, update, and quality of journals.

## **Multiple roles for insulin in the brain**

The presence and expression of insulin receptors (IRs) in the hippocampus and cerebral cortex emphasize their major role in the cognitive process [17–19]. The expression of glucose

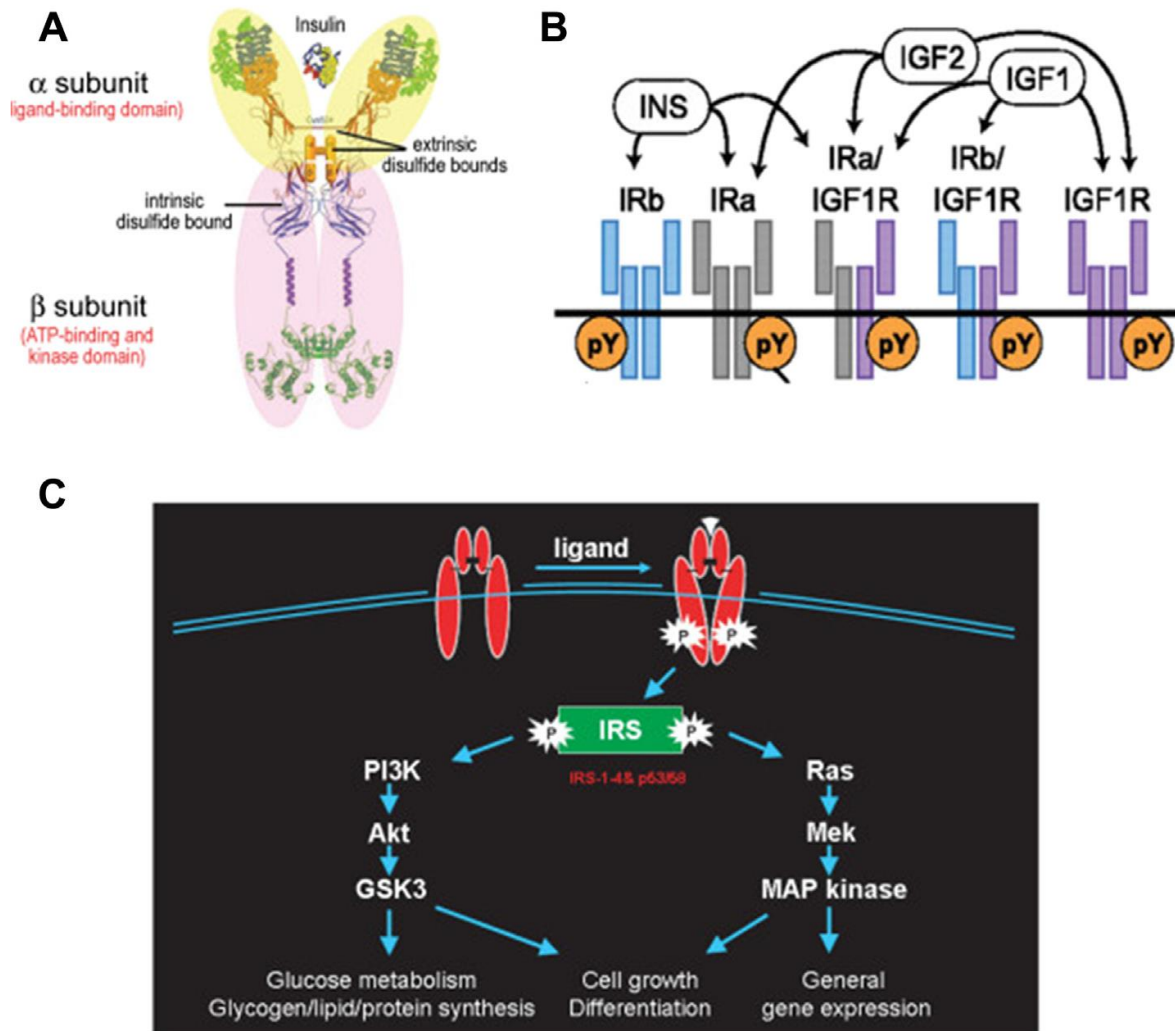


Fig. 1. Insulin receptor structure and signaling. (A) Insulin receptor monomer, composed of an  $\alpha$  (yellow) and  $\beta$  subunit (pink) bridged by an intrinsic disulfide bond, which dimerizes with another insulin receptor monomer through extrinsic disulfide bonds to form a functional receptor. (B) Ligand selectivity of the insulin receptor homodimer or heterodimer with the insulin-like growth factor (IGF)-1 receptor. Note that the homodimer of the splice variant IRa, the predominant form of insulin receptor in the brain, binds specifically to insulin (INS), whereas the heterodimer with the IGF-1 receptor binds to not only INS but also IGF-1 and IGF-2. (C) Insulin receptor signaling initiated by ligand binding activates tyrosine autophosphorylation in the  $\beta$  subunit, which stimulates two major downstream pathways, the phosphoinositide-3 kinase (PI3 K)/Akt and Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades, through insulin receptor substrates (IRSs) and results in a diverse series of cellular processes in peripheral tissues. Adapted and modified from Shu-Ling Chiu and Hollis T. Cline Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev.* 2010;5:7.

or both in those with metabolic syndrome (MetS) [37]. Brain autopsy studies reported microscopic vascular and nonvascular white matter abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus (T2 DM), which are not detected with conventional structural magnetic

resonance imaging but recorded with diffusion tensor imaging, a non-invasive technique that is sensitive to white matter fiber damage, demyelination, and axonal changes [38,39].

Perturbation of IRs plays an important role in the pathogenesis of insulin resistance (IRe), obesity and MetS. Mice with IR gene disruption specifically in the neurons (neuron-specific insulin receptor knockout), mainly females, showed increased food intake. Both male and female mice developed diet-sensitive obesity, increased plasma leptin levels, mild IRe, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia [40], features that are reminiscent of T2 DM and MetS in humans. These results emphasize the importance of neuronal IRs in glucose homeostasis and their role in the pathogenesis of obesity, T2 DM, and MetS. Stilmann-Salgado rats [e-SS], a non-obese model of DM, developed mild T2 DM at 6 mo of age with liver and renal impairment, similar to diabetic nephropathy [41,42], in which we noted a significant neuronal apoptosis that could be related to the development of DE (unpublished data).

## Molecular basis linked to neuronal death in DE

Under hyperglycemic conditions, extracellular proteins and hemoglobin are progressively glycosylated (nonenzymatic glycosylation) resulting in the formation of AGEs that stimulate the receptor of AGEs (RAGE) and integrins linked to cell membranes that lead to the overexpression of 3-inositol and overstimulation of MAPkinase and ERKinase pathways. These changes result in paraptosis, a non-apoptotic cell death program. Paraptosis is induced by insulin-like growth factor I receptor (among other inducers) and is mediated by mitogen-activated protein kinase [43], which may lead to programmed cell death in the CNS [44] that could underlie the development of DE.

### *Hypoglycemia*

Hypoglycemia is linked to cognitive dysfunction and, in turn, cognitive impairment [45]. Repetitive episodes of moderate to severe hypoglycemia have been implicated in the development and progression of cognitive dysfunction seen in DE. During acute hypoglycemic episodes, the performance of immediate verbal and visual memory, working memory, delayed memory, visuomotor and visuospatial skills, and global cognitive dysfunction are impaired. These abnormalities occur despite glucose levels being brought to near normal by the triggering of counterregulatory hormones in many individuals [46]. In young patients with DM, enlargement of the hippocampus was observed, reflecting pathologic reaction to hypoglycemia, which may disrupt normal development of brain and results in gliosis and reactive neurogenesis [47]. Indeed, a close association between multiple severe episodes of hypoglycemia and impaired cognitive function in patients with T1 DM was reported in the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) [48]. Results from the DCCT found cognitive perturbations to be significant because elderly brains are more sensitive to hypoglycemia [48–50].



### *Hyperglycemia*

Hyperglycemia may contribute to DE as a result of the activation of the sorbitol–aldose reductase pathway, which reduces excess glucose to sorbitol, and increases the formation of AGEs, which also has been implicated in microvascular damage to retina, kidneys, and nerves. Diabetic mice with cognitive impairment showed increased expression of AGEs, enhanced generation of reactive oxygen species, and activation of protein kinase C in neurons and glial cells, together with alterations in white matter and myelin [3,51–53]. STZ-induced diabetic rats showed increased sorbitol levels in cranial and sciatic nerves, cerebral cortex, and retina [15]. Sorbitol accumulation was reduced significantly when the animals were treated with the aldose reductase inhibitors tolrestat and sorbinil, which corresponded with improvement in cognitive function [53,54]. Altered neurotransmitter function, cognitive dysfunction, and impairment of long-term potentiation reverted to normal after treatment with insulin in this murine model [55].

### *Glycemic variability*

In both types 1 and 2 diabetes, a strong association has been shown between development of the disease and average mean levels of glycemia measured as hemoglobin A1c (HbA1c), and the occurrence of target organ damage. Altered values of HbA1c could be closely related to microvascular complications seen in the retina, renal tissue, and peripheral nerves, and accelerated atherosclerotic macrovascular disease affecting the heart, the brain, and the lower extremities [56]. These results emphasize the importance of good glycemic control to prevent target organ damage in DM.

### *Role of vascular disease*

Longstanding DM is known to increase the risk for thrombotic strokes and vascular diseases by almost two- to sixfold [45]. Microvascular complications, atherosclerosis, and severe hypoglycemic events increase the risk for dementia [57]. Autopsy studies revealed that patients with longstanding type 1 and 2 diabetes showed histopathologic abnormalities related to vascular diseases such as diffuse brain degeneration, pseudocalcinosis, and cranial nerve demyelization along with capillary basement membranes thickening [58,59].

### *Insulin resistance*

The brain is an insulin-dependent organ [60,61]. IRs and their mRNA expression are widely seen in rat brain, especially in the olfactory bulb, hypothalamus, hippocampus, cerebellum, piriform cortex, cerebral cortex, and amygdala [61]. In humans, positron emission tomography (PET) revealed an increase in brain glucose metabolism in the setting of hyperinsulinemia and decrease in individuals with peripheral IRe [62]. Patients with memory impairment and AD exhibited improvement in verbal memory following intranasal instillation of insulin, which had no effect on peripheral glucose or insulin levels but increased CNS insulin levels [63]. Patients with AD have reduced cerebral glucose uptake as measured by PET and also showed less GLUT8 in brain capillaries, frontal cortex, hippocampus, caudate nucleus, parietal, occipital, and temporal lobe compared with healthy controls [64,65]. IRe contributes to cognitive dysfunction when associated with formation

of senile plaques [66–68]. Thus, some of the factors that could contribute to brain damage seen in diabetics include cerebral vascular atherosclerosis, hypertension, hyperglycemia, obesity, dyslipidemia, and IRe [64,69].

### *Cortisol*

Patients with T2DM have an up-regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis, with increased serum cortisol compared with controls [70,71]. Patients without diabetes treated with dexamethasone, corticosterone, and hydrocortisone performed worse in memory testing [72]. Patients with Cushing’s disease have decreased memory performance, attention, reasoning, and concept formation compared with healthy controls. The abnormalities in Cushing’s could be attributed to a significant reduction in cerebral glucose metabolism as recorded by PET scan. In animal studies, treatment with glucocorticoids induced structural and consequent functional changes in the hippocampus neurons [73,74].

### *Inflammation*

The exact reason for the association of LGCI with diseases such as obesity, CVDs, T2 DM, and cancer is not well understood. Inflammation is a protective response that unavoidably occurs at the cost of normal tissue function. Substantial changes in environment that results in epigenetic changes in the expression of several genes, which are inherited by the progeny, maladaptation to the changes in the environment, and changing food habits could outpace genetic adaptation through natural selection and may lead to increase in disease susceptibility [75]. T2 DM is an LGCI process with higher levels of inflammatory markers such as C-reactive protein,  $\alpha$ 1-antichymotrypsin, interleukin-6, and intercellular adhesion molecule 1 compared with control populations [76,77]. Increased activation of the renin–angiotensin system has been related to CVD. The detrimental effects of T2DM on the renin–angiotensin system with regard to insulin secretion are mediated by a reduction in pancreatic blood flow and induction of islet fibrosis and oxidative stress, as well as persistency of LGCI [78,79].

LGCI is associated with a hyperlipidemic state, preceding the diagnosis of diabetes, which up-regulates the production of proinflammatory cytokines and toll-like receptors [80]. Diabetic neuropathy, the most frequent chronic diabetic complication, is related to oxidative stress and systemic LGCI [80].

Inflammation and microglia activation also are related to neurodegenerative diseases [81,82]. Low-grade systemic inflammation is also noted in erectile dysfunction (ED), diabetic polyneuritis, and in patients with chronic neurodegenerative processes, suggesting that diabetic encephalopathy could be considered a neurodegenerative disease.

### *Lipid metabolism*

DM is associated with impaired metabolism of essential fatty acids (EFAs) as a result of decreased activity of D6 and D5 desaturases, enzymes that are essential for the conversion of the dietary EFAs linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids, to their respective long-chain metabolites, including  $\gamma$ -linolenic acid, arachidonic acid, and eicosapentaenoic acid, and docosahexaenoic acid (DHA), respectively. This may explain reduced arachidonic acid

and DHA levels in the membrane phospholipid of neurons and sciatic nerves in patients with DM [83].

Additionally, excess consumption of calories, impaired glucose tolerance, abdominal or central obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, and reduced high-density lipoprotein cholesterol all seem to play an important role in the development of age-related cognitive decline, mild cognitive impairment, vascular dementia, and AD [84].

Palmitic acid (PA), one of the most common saturated fatty acids found in Western food such as butter, cheese, milk, meat, and seed oils, activate macrophages [85]. PA also increases proinflammatory cytokine and chemokine expression in myotubes, phosphorylated c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase, and other markers of inflammation and at the same time suppress  $\alpha$ -b-k protein expression and phosphorylated AKT [85]. High levels of saturated and monounsaturated fatty acids, such as PA and oleic acid, when combined with hyperinsulinemia, may activate human monocytes to produce proinflammatory cytokines such as interleukin-6, which contributes to the development of LGCI, that is characteristic of IRe [86]. Neuroinflammation is believed to be one of the downstream events in the pathologic cascade of AD and ED. Imbalance in the form of excess consumption of saturated fatty acids and trans-fats may induce EFA deficiency [87]. PA reduces the activity and expression of insulin-degrading enzyme (IDE), a key protease responsible for the degradation of amyloid beta (Ab) in neurons [88]. Prolonged exposure to free fatty acids, PA, and oleic acid, reduced glucose-stimulated insulin secretion, and increased apoptosis of human pancreatic  $\beta$ -cells that seems to be partially dependent on ceramide and by downregulation of Bcl-2 [89,90]. In contrast to this, incubation with DHA up-regulated IDE levels in primary hippocampal neurons, showing differential effects of saturated fatty acids and PUFAs on IDE expression [88].

### *Insulin-degrading enzyme*

Nephrilysin and IDE play a key role in degrading amyloid monomer, a building stone of the plaques Ab of AD, so upregulation of IDE may be a useful approach to reduce amyloid deposit [91]. IDE activity is significantly decreased in individuals with mild cognitive impairment, and plays an essential role in insulin homeostasis, implicating a close relationship between AD and T2 DM [92]. Treatment of hippocampal neurons with insulin increased IDE protein levels by 25%, and led to PI3 K activation that is evidenced by Akt phosphorylation, which was blocked by PI3 K inhibitors [91,93].

### *Amyloid*

Pancreatic islets in patients with T2DM are characterized by  $\beta$  cell loss and deposition of islet amyloid, findings that mimic neuronal loss and Ab deposition seen in AD [94,95]. The composition of islet and neural  $\beta$ -amyloid are similar and are toxic to cells. Decreased function of Ab-protein and IDE may underlie or contribute to AD. This may explain the recently recognized association among hyperinsulinemia, diabetes, and AD [95].

### *Oxidative stress*

Hyperglycemia is linked to impaired mitochondrial function, which might play an important role in accelerated oxidative damage observed in the brain of individuals with diabetes. T2 DM is associated with increased oxidative stress, which may lead to an increase in DNA damage that could be ameliorated by a healthy diet that contains well-balanced antioxidants [96]. There is a close relationship between oxidative stress and AMPK activation in various chronic disorders, including chronic degenerative brain disease seen in diabetes [97–99]. In the STZ-induced model of DE, brains displayed up-regulated protein expression of AdipoR1, p-AMPK $\alpha$ 1, Tak1, GLUT4, NADPH oxidase subunits, caspase-12, and 3-NT and increased lipi peroxidation compared with controls [98,99].

### *Impaired tau phosphorylation*

T2DM is reported to increase the risk for dementia, including AD. A decrease in the levels and activities of several components of the insulin–PI3 K–AKT signaling pathway was found in AD and T2 DM [92]. The deficiency of insulin–PI3 K–AKT signaling was more severe in individuals with both T2 DM and AD. This could lead to the activation of glycogen synthase kinase-3  $\beta$  and major tau kinase. Levels and activation of the insulin–PI3 K–AKT signaling components are correlated negatively with the level of tau phosphorylation and positively with protein O-GlcNAcylation, suggesting that impaired insulin–PI3 K–AKT signaling might contribute to neurodegeneration [92]. In STZ diabetic rats, hippocampus tau protein also was hyperphosphorylated, accompanied by lowered phosphorylation levels of Akt, GSK-3, and protein phosphatase-2 A [99].

### **Clinical features of DE**

Advances in the management of acute hyperglycemia have virtually eliminated frequent complications of diabetes seen in the past such as premature death due to hyperosmolar or acetoacidotic coma. Indeed, a better understanding of the molecular basis of glycosylation, atherosclerosis, and ischemia in both microvascular and macrovascular beds resulted in a reduction of vascular complications when applied properly in a timely manner along with appropriate advice regarding nutrition and healthy lifestyle. These combined strategies led to increased life expectancy of patients with T2 DM thus reaching ages similar to the general population. As a result, this increased life expectancy led to the recognition of a relatively new complication described in 1992 as DE [3–5]. Patients with longstanding diabetes (both types 1 and 2) have cognitive perturbations [100,101]. The age of onset of diabetes and poor control of hyperglycemia are contributing factors to cognitive dysfunction seen in this population [100,101]. Motor and cognitive dysfunctions are evident when patients with diabetes show slowing information-processing speed; worsening psychomotor efficiency; and perturbations in motor speed, vocabulary, general intelligence, visuoconstruction, attention, somatosensory examination, motor strength, memory, and executive functions [45]. These abnormalities are significantly more precocious and severe in patients with diabetes compared with non-diabetics, leading to significant and progressive deterioration in higher mental capacities [102]. Progression of DE is evidenced by heavy perturbation of attention, recent declarative, procedural,

spatiotemporal, and delayed memory. The ability to plan, learn new concepts and skills, development of verbal or written speech, and associate ideas with fluidity increasingly deteriorate.

Not only are intellectual abilities affected, motor skills are also damaged as these individuals may no longer be able to walk quickly, and may become hesitant in balance, thus leading to falls. Sleeping disturbances, insomnia, and early awakening often are recorded. These patients frequently develop depression, which correlates with the discussed perturbations in PUFA metabolism in major mood disorders such as depression and bipolar disorder [103]. The slow evolution of ED allows the patient, family, and close relatives to adapt to these changes and hence, they may go unnoticed [101]. Eventually, progression of ED could interfere with daily routine tasks such as misapplication of insulin, taking medicine, and eating, and may even result in the occurrence of dangerous accidents in the home.

Psychological diagnostic testing may corroborate these symptoms. Patients with a score <23 on the Mini-Mental Status Exam fared worse on measures of self-care and ability to perform activities of daily living, and the clock, set, and Yesavage tests [104]. Cerebral atrophy was confirmed in these patients with ED by magnetic resonance imaging studies [105–107] (Fig. 2).

## **Nutrition therapeutic options and approaches**

### *Antioxidants*

A proanthocyanidin, naturally occurring antioxidant derived from grape seed extract seems to reduce injuries to diabetic rat cerebral cortex by modulating RAGE/nuclear factor- $\kappa$ B p65 pathway [98,108]. Curcumin could prevent hyperglycemia-mediated DE, by down-regulation of AMPK-mediated gluconeogenesis in addition to its antioxidant property [99,109]. However, excess of antioxidants also may be harmful because oxidation is a complex cellular phenomenon vital for normal metabolism. Hence, maintaining appropriate balance between pro- and antioxidant molecules is important to prevent several diseases [110–112].

### *Docosahexaenoic acid*

As already discussed, cognitive impairment is related to neuroinflammation. It is known that  $\omega$ -3 PUFAs have antiinflammatory action [111–114].

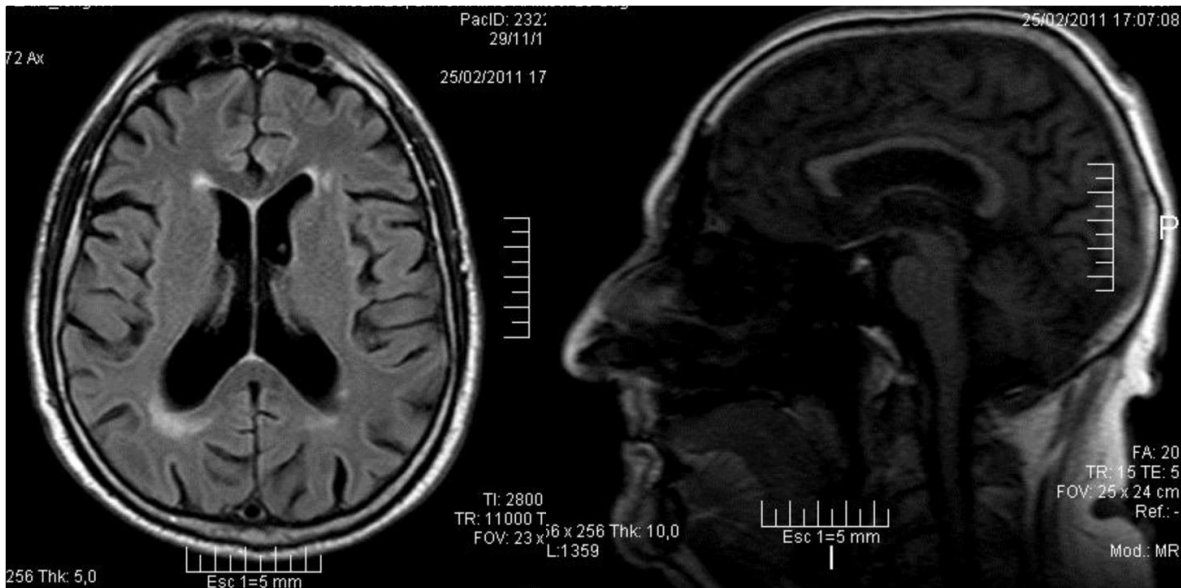


Fig. 2. Cerebral resonance nuclear magnetic image of a 70-y-old man with type 2 diabetes mellitus, with insulin-requirement for 10 y, hypertrygliceridemic, with heavy cognitive impairment. Image shows enlarged ventricles and cortical and temporal atrophy.

In a diabetic rodent model, DHA supplementation decreases reactive oxygen species and inflammatory cytokine production in microglial and neuronal cells, attenuating degenerative changes in hippocampus [113,115]. DHA also attenuated Ab secretion, enhanced neuroprotectin synthesis, which represses inflammation, oxidative stress, and cell apoptosis induced by Ab 42, and thus promoted neuronal survival [115]. Fish oil dietary supplementation, a rich source of u-3, exerts neuron-protective function in diabetic rats through antiapoptotic pathways and significantly improved the ability of learning and memory [116–118].

## Conclusion

The pathophysiological mechanisms involved in the onset and progression of DE include longstanding DM, alterations in glucose and lipid metabolism, oxidative stress, increased levels of AGEs, IRe, low efficiency of IDE enzyme, and persistent LGCI. Changes in these bioactive molecules could result in decreases in neuronal survival, neurofibrillar accumulation, and widespread cell death via paraptosis, which ultimately result in the onset and progression of DE.

As discussed here, ED may be prevented or delayed, at least partly, by regular consumption of dietary nutraceuticals like u-3 PUFAs and natural antioxidants in optimal amounts. Some of the approaches that could be of therapeutic benefit in ED include regular consumption of u-3 PUFAs and natural antioxidants, healthy lifestyle, and strict control of hyperglycemia.

## Acknowledgments

The authors are indebted to E. Sticcotti for the English technical revision. The authors also acknowledge Fundación “Amigos de los Diabéticos,” Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. GT Diaz-Gerevini and A. Dain are PhD students at Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. A. Dain is supported partially by a fellowship PROMED of Ministerio de Educación de la Nación, Argentina.

This work was supported by funds provided by CONICET, SECYT-UNC, and SECYT-UNLaR.

## References

- [1] Schoolwerth AC, Engelgau MM, Rufo KH, Vinicor F, Hostetter TH, Chianchiano D, et al. Chronic kidney disease: a public health problem that needs a public health action plan. *Prev Chronic Dis* 2006;3:A57.
- [2] Schoolwerth AC, Engelgau MM, Hostetter TH. A public health action plan is needed for chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2005;12:418–23.
- [3] Biessels GJ, Van Der Heide LP, Kamal A, Bley RLAW, Gispen WH. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 2002;441:1–14.
- [4] Biessels GJ, Luchsinger JA. *Diabetes and the brain*. New York, NY: Humana Press; 2009.
- [5] Korf ESC, White LR, Scheltens P, Launer LJ. Brain aging in very old men with type 2 diabetes: the Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes Care* 2006;29:2268–74.
- [6] Korf ESC, Wahlund L-O, Visser PJ, Scheltens P. Medial temporal lobe atrophy on MRI predicts dementia in patients with mild cognitive impairment. *Neurology* 2004;63:94–100.
- [7] Hong M, Lee VM. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem* 1997;272:19547–53.
- [8] Kim B, Backus C, Oh S, Feldman EL. Hyperglycemia-induced Tau cleavage in vitro and in vivo: a possible link between diabetes and Alzheimer’s disease. *J Alzheimer Dis* 2013;34:727–39.
- [9] Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL. Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes.
- [10] Edbauer D, Willem M, Lammich S, Steiner H, Haass C. Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem* 2002;277:13389–93.
- [11] Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 1998;273:32730–8.
- [12] Dickson DW, Sinicropi S, Yen SH, Ko LW, Mattiace LA, Bucala R, et al. Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 1996;17:733–43.
- [13] Calegari VC, Torsoni AS, Vanzela EC, Ara\_ujo EP, Morari J, Zoppi CC, et al. Inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function. *J Biol Chem* 2011;286:12870–80.
- [14] Keane DC, Takahashi HK, Dhayal S, Morgan NG, Curi R, Newsholme P. Arachidonic acid actions on functional integrity and attenuation of the negative effects of palmitic acid in a clonal pancreatic b-cell line. *Clin Sci*

(Lond) 2011;120:195–206.

[15] Hernáandez-Fonseca JP, Rincón J, Pedraza A, Viera N, Arcaya JL, Carrizo E, et al. Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex, cerebellum, and hypothalamus from diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 2009;2009:329632.

[16] Fadel JR, Jolivald CG, Reagan LP. Food for thought: the role of appetitive peptides in age-related cognitive decline. *Ageing Res Rev*; 2013:1–13.

[17] Wickelgren I. Tracking insulin to the mind. *Science* 1998;280:517–9.

[18] Havrankova J, Brownstein M, Roth J. Insulin and insulin receptors in rodent brain. *Diabetologia* 1981;20:268–73.

[19] Alquier T, Leloup C, Lorsignol A, Penicaud L. Translocable glucose transporters in the brain: where are we in 2006? *Diabetes* 2006;55:S131–8.

[20] Woods SC, Benoit SC, Clegg DJ. The brain-gut-islet connection. *Diabetes* 2006;55:S114–21.

[21] Schwartz MW, Porte D. Diabetes, obesity and the brain. *Science* 2005;307:375–9.

[22] Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3171–80.

[23] Navarro A, Díaz MP, Muñoz SE, Lantieri MJ, Eynard AR. Characterization of meat consumption and risk of colorectal cancer in Cordoba, Argentina. *Nutrition* 2003;19:7–10.

[24] Navarro A, Muñoz SE, Lantieri MJ, del Pilar Diaz M, Cristaldo PE, de Fabro SP, et al. Meat cooking habits and risk of colorectal cancer in Cordoba, Argentina. *Nutrition* 2004;20:873–7.

[25] Andreatta MM, Navarro A, Muñoz SE, Aballay L, Eynard AR. Dietary patterns and food groups are linked to the risk of urinary tract tumors in Argentina. *Eur J Cancer Prev* 2010;19:478–84.

[26] Niclis C, Diaz Mdel P, Eynard AR, Roman MD, La Vecchia C. Dietary habits and prostate cancer prevention: a review of observational studies by focusing on South America. *Nutr Cancer* 2012;64:23–33.

[27] Aballay LR, Eynard AR, Díaz MDP, Navarro A, Muñoz SE. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutr Rev* 2013;71:168–79.

[28] Eynard AR, Navarro A. Crosstalk among dietary polyunsaturated fatty acids, urolithiasis, chronic inflammation, and urinary tract tumor risk. *Nutrition* 2013;29:930–8.

[29] Holt TA, Kumar S, Watkins PJ. ABC of diabetes. 6th ed. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell/BMJ Books; 2010.

[30] Lee HK, Kumar P, Fu Q, Rosen KM, Querfurth HW. The insulin/Akt signaling pathway is targeted by intracellular beta-amyloid. *Mol Biol Cell* 2009;20:1533–44.

[31] Liu Y, Hong X, Kappler J, Jiang L, Zhang R, Xu L, et al. Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. *Nature* 2003;423:49–56.

[32] Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* 1999;274:34893–902.

[33] Meyts P De, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:769–83.

[34] Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 1994;372:746–54.

[35] McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central



- nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 2004;490:13–24.
- [36] Vargas R, Rincón J, Pedraza A, Viera N, Hernández-Fonseca JP, Peña C, et al. Role of angiotensin II in the brain inflammatory events during experimental diabetes in rats. *Brain Res* 2012;1453:64–76.
- [37] Shimoji K, Abe O, Uka T, Yasmin H, Kamagata K, Asahi K, et al. White matter alteration in metabolic syndrome: diffusion tensor analysis. *Diabetes Care* 2013;36:696–700.
- [38] Reijmer YD, Leemans A, Brundel M, Kappelle LJ, Biessels GJ. Disruption of the cerebral white matter network is related to slowing of information processing speed in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2013;1–20.
- [39] Reijmer YD, Brundel M, De Bresser J, Kappelle LJ, Leemans A, Biessels GJ. Microstructural white matter abnormalities and cognitive functioning in type 2 diabetes: a diffusion tensor imaging study. *Diabetes Care* 2012.
- [40] Das UN. Is type 2 diabetes mellitus a disorder of the brain? *Nutrition* 2002;18:667–72.
- [41] Daniele SM, Arriaga S, Martínez SM, Tarrés MC, Montenegro SM, D'Ottavio AE, et al. Onset and evolution of nephropathy in rats with spontaneous diabetes mellitus. *J Physiol Biochem* 2000;56:45–53.
- [42] Tarrés MC, Martínez SM, Montenegro S, Llorens A, Picena JC, Naves A. The eSS rat. A model of non-insulin-dependent human diabetes. *Amer J Pathol* 1992;141:761–3.
- [43] Sperandio S, Poksay K, De Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, et al. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ* 2004;11:1066–75.
- [44] Sperandio S, De Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:14376–81.
- [45] Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev* 2008;29:494–511.
- [46] Wysocki T, Harris MA, Mauras N, Fox L, Taylor A, Jackson SC, et al. Absence of adverse effects of severe hypoglycemia on cognitive function in school-aged children with diabetes over 18 months. *Diabetes Care* 2003;26:1100–5.
- [47] Hershey T, Perantie DC, Wu J, Weaver PM, Black KJ, White NH. Hippocampal volumes in youth with type 1 diabetes. *Diabetes* 2010;59:236–41.
- [48] The Diabetes Control and Complications Trial. The effect of intensive treatment of diabetes on development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977–86.
- [49] Lee B-W, Jin ES, Hwang H-S, Yoo H-J, Jeong JH. A case of hypoglycemic brain injuries with cortical laminar necrosis. *J Korean Med Sci* 2010;25:961–5.
- [50] Auer RN. Hypoglycemic brain damage. *Forensic Sci Int* 2004;146:169–75.
- [51] Hudson BI, Hofmann MA, Bucciarelli L, Wendt T, Moser B, Lu Y, et al. Glycation and diabetes: the RAGE connection. *Curr Sci* 2002;83:1515–21.
- [52] Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;108:949–55.
- [53] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615–25.
- [54] Klein JP, Waxman SG. The brain in diabetes: molecular changes in neurons and their implications for end-organ damage. *Lancet* 2003;2:548–54.
- [55] Skeberdis VA, Lan J, Zheng X, Zukin RS, Bennett MVL. Insulin promotes

- rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3561–6.
- [56] Brownlee M, Hirsch IB. Glycemic variability: a hemoglobin A1 c-independent risk factor for diabetic complications. *JAMA* 2006;295:1707–8.
- [57] Exalto LG, Whitmer RA, Kappelle LJ, Biessels GJ. An update on type 2 diabetes, vascular dementia and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2012;47:858–64.
- [58] Medicina F De, Coimbra U De. Disfunc, ~ao Endotelial na Diabetes Tipo 2: introduction. *Rev Port Cardiol* 2007;26:609–19.
- [59] Bloomgarden ZT. Cardiovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 2002;1:313–8.
- [60] Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Therap*; 2012:136.
- [61] Das UN, Repossi G, Dain A, Eynard AR. Is insulin resistance a disorder of the brain? *Front Biosci* 2011;16:1–12.
- [62] Bingham EM, Hopkins D, Smith D, Pernet A, Hallett W, Reed L, et al. The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18 fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes* 2002;51:3384–90.
- [63] Reger MA, Watson GS, Green PS, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, et al. Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *J Alzheimers Dis* 2008;13:323–31.
- [64] Maher PA, Schubert DR. Metabolic links between diabetes and Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 2009;9:617–30.
- [65] Reger MA, Watson GS, Frey WH, Baker LD, Cholerton B, Keeling ML, et al. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol Aging* 2006;27:451–8.
- [66] Nielson KA, Nolan JH, Berchtold NC, Sandman CA, Mulnard RA, Cotman CW. Apolipoprotein-E genotyping of diabetic dementia patients: is diabetes rare in Alzheimer's disease? *J Am Geriatr Soc* 1996;44:897–904.
- [67] Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, et al. Elevation of plasma beta-amyloid level by glucose loading in Alzheimer mouse models. *Biochem Biophys Res Comm* 2009;385:193–7.
- [68] Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, et al. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Ab deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7036–41.
- [69] S Roriz-Filho J, S\_a-Roriz TM, Rosset I, Camozzato AL, Santos AC, Chaves MLF, et al. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:432–43.
- [70] Prpi\_c-Kri\_zevac I, Canecki-Var\_zi\_c S, Bili\_c-\_Cur\_ci\_c I. Hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with type 2 diabetes and relations with insulin resistance and chronic complications. *Wien Klin Wochenschr* 2012;124:403–11.
- [71] Ott A, Stolk RP, Hofman A, Van Harskamp F, Grobbee DE, Breteler MM. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia* 1996;39:1392–7.
- [72] Brown ES, Rush AJ, McEwen BS. Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:474–84.
- [73] Newcomer JW, Selke G, Melson AK, Hershey T, Craft S, Richards K, et al. Decreased memory performance in healthy humans induced by stresslevel cortisol treatment. *Arch Gen Psychiatry* 1999;56:527–33.
- [74] Heffelfinger AK, Newcomer JW. Glucocorticoid effects on memory function over the human life span. *Dev Psychopathol* 2001;13:491–513.

- [75] Okin D, Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol* 2012;22:R733–40.
- [76] Ziegler D. Type 2 diabetes as an inflammatory cardiovascular disorder. *Curr Mol Med* 2005;5:309–22.
- [77] Sima AAF, Zhang W, Kreipke CW, Rafols JA, Hoffman WH. Inflammation in diabetic encephalopathy is prevented by C-peptide. *Rev Diabet Stud* 2009;6:37–42.
- [78] Trovati M, Massucco P, Anfossi G, Cavalot F, Mularoni E, Mattiello L, et al. Insulin influences the renin-angiotensin-aldosterone system in humans. *Metabol Clin Experim* 1989;38:501–3.
- [79] Perkins JM, Davis SN. The renin-angiotensin-aldosterone system: a pivotal role in insulin sensitivity and glycemic control. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:147–52.
- [80] Nguyen DV, Shaw LC, Grant MB. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:170.
- [81] Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2010;6:193–201.
- [82] Amor S, Puentes F, Baker D, Van Der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 2010;129:154–69.
- [83] Coste TC, Gerbi A, Vague P, Pieroni G, Raccach D. Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid-enriched phospholipids in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2003;52:2578–85.
- [84] Frisardi V, Solfrizzi V, Seripa D, Capurso C, Santamato A, Sancarlo D, et al. Metabolic-cognitive syndrome: a cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2010;9:371–9.
- [85] Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Nolen GT, Phanavanh B, Starks T, et al. Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action. *Amer J Physiol Endocrin Metabol* 2009;296:E1300–10.
- [86] Bunn RC, Cockrell GE, Ou Y, Thraillkill KM, Lumpkin CK, Fowlkes JL. Palmitate and insulin synergistically induce IL-6 expression in human monocytes. *Cardiov Diabetol* 2010;9:73.
- [87] Eynard AR. Is the risk of urinary tract tumorigenesis enhanced by a marginal chronic essential fatty acid deficiency (EFAD)? *Nutrition* 1998;14:211–6.
- [88] Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S. Aβ-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2008;18:240–52.
- [89] Park JY, Kim MJ, Kim YK, Woo JS. Ceramide induces apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent pathways in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Arch Toxicol* 2011;85:1057–65.
- [90] Movsesyan VA, Yakovlev AG, Dabaghyan EA, Stoica BA, Faden AI. Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway. *Biochem Biophys Res* 2002;299:201–7.
- [91] Zhao LX, Teter B, Morihara T, Lim GP, Ambegaokar SS, Ubeda OJ, et al. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade. *J Neurosci* 2004;24:11120–6.
- [92] Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X. Deficient brain insulin signaling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol* 2011;225:54–62.
- [93] Qu Z, Jiao Z, Sun X, Zhao Y, Ren J, Xu G. Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Res* 2011;1383:300–6.
- [94] Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease.

- Internat J Biochem Cell Biol 2003;35:1505–35.
- [95] Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4162–7.
- [96] Müllner E, Brath H, Pleifer S, Schiermayr C, Baierl A, Wallner M, et al. Vegetables and PUFA-rich plant oil reduce DNA strand breaks in individuals with type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:328–38
- [97] Kamboj SS, Sandhir R. Protective effect of N-acetylcysteine supplementation on mitochondrial oxidative stress and mitochondrial enzymes in cerebral cortex of streptozotocin-treated diabetic rats. *Mitochondrion* 2011;11:214–22.
- [98] Lu M, Xu L, Li B, Zhang W, Zhang C, Feng H, et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidin extracts on cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats through modulating AGEs/RAGE/NF-kappaB pathway. *J Nutr Sci Vitam* 2010;56:87–97.
- [99] Lakshmanan AP, Watanabe K, Thandavarayan RA, Sari FR, Meilei H, Soetikno V, et al. Curcumin attenuates hyperglycaemia-mediated AMPK activation and oxidative stress in cerebrum of streptozotocin-induced diabetic rat. *Free Radic Res* 2011;45:788–95.
- [100] Yaffe K, Blackwell T, Whitmer RA, Krueger K, Barrett Connor E. Glycosylated hemoglobin level and development of mild cognitive impairment or dementia in older women. *J Nutr Health Aging* 2006;10:293–5.
- [101] Sinclair AJ, Girling AJ, Bayer AJ. Cognitive dysfunction in older subjects with diabetes mellitus: impact on diabetes self-management and use of care services. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;50:203–12.
- [102] Bergman RN, Pacini G, Porte D. Pathogenesis of age-related glucose intolerance in man: Insulin resistance and decreased-cell function. *J Clin Endocrin Metab* 1985;60:13–20.
- [103] Parker G, Gibson NA, Brotchie H, Heruc G, Rees A-M, Hadzi-Pavlovic D. Omega-3 fatty acids and mood disorders. *Am J Psychiatry* 2006;163:969–78.
- [104] Espeland MA, Miller ME, Goveas JS, Hogan PE, Coker LH, Williamson J, et al. Cognitive function and fine motor speed in older women with diabetes mellitus: results from the women's health initiative study of cognitive aging 1937. *J Womens Health* 2011;20:1435–43.
- [105] Vermeer SE, Den Heijer T, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Breteler MMB. Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. *Stroke* 2002;33:21–5.
- [106] Manschot SM, Biessels GJ, De Valk H, Algra A, Rutten GEHM, Van Der Grond J, et al. Metabolic and vascular determinants of impaired cognitive performance and abnormalities on brain magnetic resonance imaging in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007;50:2388–97.
- [107] Scheltens P, Barkhof F, Leys D, Pruvo JP, Nauta JJ, Vermersch P, et al. A semiquantitative rating scale for the assessment of signal hyperintensities on magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci* 1993;114:7–12.
- [108] Xu L, Li B, Cheng M, Zhang W, Pan J, Zhang C, et al. Oral administration of grape seed proanthocyanidin extracts downregulate RAGE dependant nuclear factor-kappa BP65 expression in the hippocampus of streptozotocin induced diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008;116:215–24.
- [109] Suryanarayana P, Satyanarayana A, Balakrishna N, Kumar PU, Reddy GB. Effect of turmeric and curcumin on oxidative stress and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. *Med Sci Monit* 2007;13:BR286–92.
- [110] Munoz SF, Silva RA, Lamarque A, Guzman CA, Eynard AR. Protective

capability of dietary Zizyphus mistol seed oil, rich in 18:3, n-3, on the development of two murine mammary gland adenocarcinomas with high or low metastatic potential. *Prostaglandins Leukot Essent* 1995;53: 135–8.

[111] Lankinen M, Schwab U, Erkkilä A, Seppänen-Laakso T, Hannila M-L, Mussalo H, et al. Fatty fish intake decreases lipids related to inflammation and insulin signaling—a lipidomics approach. *PLoS One* 2009;4:9.

[112] Das UN. Can essential fatty acids reduce the burden of disease(s)? *Lipids Health Dis* 2008;7:9.

[113] Lu D-Y, Tsao Y-Y, Leung Y-M, Su K-P. Docosahexaenoic acid suppresses neuroinflammatory responses and induces heme oxygenase-1 expression in BV-2 microglia: Implications of antidepressant effects for  $\omega$ -3 fatty acids. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:2238–48.

[114] Lim WS, Gammack JK, Van Niekerk J, Dangour AD. Omega 3 fatty acid for the prevention of dementia. *Cochrane Database*; 2006:CD005379. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD005379.pub2>.

[115] Oster T, Pillot T. Docosahexaenoic acid and synaptic protection in Alzheimer's disease mice. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:791–8.

[116] Das UN. *Metabolic syndrome pathophysiology: the role of essential fatty acids*. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2010.

[117] Yang R-H, Wang F, Hou X-H, Cao Z-P, Wang B, Xu X-N, et al. Dietary Omega-3 Polyunsaturated fatty acids improves learning performance of diabetic rats by regulating the neuron excitability. *Neuroscience* 2012;212: 93–103.

[118] Zhao CH, Liu HQ, Cao R, Ji AL, Zhang L, Wang F, Yang RH. Effects of dietary fish oil on learning function and apoptosis of hippocampal pyramidal neurons in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res* 2012; 457:33–43.

## APENDICE 2

Este trabajo esta en proceso de publicación

**Differential effects of  $\omega$ 6 and  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and antiinflammatory nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on progressive diabetic encephalopathy (ED)-related to glycolipototoxicity in a diabetic spontaneous rat model**

**AUTHORS:** Díaz-Gerevini GT<sup>1,2</sup>, Repossì G<sup>1,3,4</sup>, Dain A<sup>1</sup>, Pasqualini ME<sup>1</sup>, Lopez CB<sup>1</sup>, Das UN<sup>5</sup>, Eynard AR<sup>1,3\*</sup>

**AFFILIATION:** <sup>1</sup> Biología Celular, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. INICSA (CONICET-Universidad Nacional de Córdoba), Campus, Enfermera Gordillo s/n, Córdoba (5000), Argentina.

<sup>2</sup> Geriatrician "San Ricardo Pampuri Centro Médico" Villa Carlos Paz, Argentina

<sup>3</sup> Cátedra de Histología y Embriología. Universidad Nacional de La Rioja, La Rioja, Argentina.

<sup>4</sup> CONICET, Argentina

<sup>5</sup> Jawaharlal Nehru Technological University, Kakinada-533 003, India and UND Life Sciences, 13800 Fairhill Road, 321, Shaker Heights, OH 44120, USA.

**\*CORRESPONDING AUTHOR:** Phone: +543514334020. Fax: +543514334021 Email: aeynard@gmail.com

### Abstract

**Objective:** To evaluate the effects of  $\omega$ 6 and  $\omega$ 3 PUFAs and the antiinflammatory agent nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on the etiopathology of glycolipototoxicity related to diabetic encephalopathy (DE) in an spontaneous diabetic model.

**Materials, methods and experimental design:** 120 spontaneous diabetic type 2(DBT2), Stillman-Salgado (e-SS) male rats, and 38 control Wistar were used. Animals received monthly  $\omega$ 3 or  $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) with or without NDGA added by

intraperitoneal (IP) route. At 6<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> month of age, the behaviour and neuromotricity performance of animals was assayed by the Hole Board Test. At 12<sup>th</sup> month, Computed Tomography (CT), histopathological studies, including apoptosis and immunohistolabelling of synaptophysin in hippocampal tissue were determined. Biochemical parameters mainly related to low grade chronic inflammation (LGCI) evaluated in plasma and central nervous system (CNS) were: gamma glutamyltranspeptidase (GGTP), hydroperoxides, lipoperoxides and nitrites, ultrasensitive C Reactive Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6) and PUFAs plasma profile.

Results: the behaviour of  $\omega$ 3 treated diabetic rats performed better than other diabetic treated or not diabetic animals in Hole-Board test. CT showed heterogeneity in brain tissue, a marker of CNS advanced damage, more evident in non-treated e-SS control and  $\omega$ 6 groups. At 12 months e-SS rats showed higher levels of oxidative stress markers, whereas in plasma and hippocampus tissue,  $\omega$ 3+NDGA group showed decreased values. Control non treated e-SS rats showed increased IL-6 in hippocampus and plasma, condition which was ameliorated by simultaneous treatment with NDGA and  $\omega$ 3. In control e-SS and  $\omega$ 6 treated rats scattered areas of spongiosis were more evident as well. Thickened and high cell dispersion zones of hippocampal CA1.  $\omega$ -3 groups had expression of synaptophysin closer to Wistar controls, a key presynaptic protein linked to neurotransmitters release.

**Conclusion:** Neurocognitive and morphological alterations in this spontaneous model of DBT2 (e-SS) rats are compatible with DE as we previously proposed. Behaviour, laboratory and macro/micro morphological assays showed that DE pathophysiology is associated with increased glycolipotoxicity, LGCI and oxidative stress burden. On the contrary animals treated with  $\omega$ 3 together with the antiinflammatory NDGA showed improvement of these parameters, approaching to the parameters observed in healthy controls Wistar. Thus,  $\omega$ 3 supplementation plus a natural plant derivative antiinflammatory compound, as NDGA, may be a suitable approach to prevent and to coadjuvant strategies in DBT2 prevention and treatment.

## Introduction

Our purpose was to assay the effect of  $\omega$ 6 and  $\omega$ 3 PUFAs supplementation with the addition of nordihydroguaiaretic acid (NDGA), a powerful natural antioxidant and antiinflammatory isolated from *Larrea divaricata*, since there are increasing evidences linking risk for diabetes type 2 (DBT2) and with LGCI(1,2) which preclude the onset of

DBT2 (2). In a murine model of spontaneous DBT2, the Stilman-Salgado (e-SS) rats, we studied the association between diabetic encephalopathy (DE) (3), neurocognitive alterations and glycolipotoxicity (4).

The concept of glycolipotoxicity refers to the combined, deleterious effects of elevated glucose and fatty acid levels on pancreatic beta-cell function and survival. Excessive levels of circulating fatty acids and glucose leads to decreased insulin secretion, impaired insulin gene expression, and in turns beta-cell death by apoptosis (5). Several pathways had been implicated in fatty-acid inhibition of insulin gene expression, including the extracellular-regulated kinase (ERK1/2) pathway, the metabolic sensor Per-Arnt-Sim kinase (PASK) and the ATF6 branch of the unfolded protein response (4).

Lipotoxicity can be observed under altered energy balance conditions and limited fat storage as happens in DBT2, neurodegenerative diseases as Parkinson's disease, Alzheimer's disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis, and during heart failure(6). Plasma concentrations of free fatty acids (FFA) are elevated in the obese subjects and in those with metabolic syndrome. These FFA and nonesterified FFA elevated levels can induce lipotoxicities, due to oxidative stress, which may impair insulin signaling and glucose response in pancreatic  $\beta$ -cells (4). Experimental and clinical data suggest that saturated FFA as palmitic acid (PA) which are taken mainly from red meats, plays a critical role in the inhibition of the insulin signaling pathway and in the induction of endoplasmic reticulum (ER) stress in hypothalamic neurons. These factors are related to an AD-like pathological pattern in primary cortical neurons by elevating oxidative stress and FFA metabolism in abnormal astrocytes, increasing apoptotic cell death in PC12 cells and neural progenitor cells (6).

Excess lipid accumulation in non adipose tissues may occur in the setting of high levels of plasma FFA or triglycerides (TG) along a process called "lipotoxicity". Human studies and animal models suggests that lipid accumulation in heart, skeletal muscle, pancreas, and liver play an important role in the pathogenesis of heart failure, obesity, metabolic syndrome and DBT2 (7). On The other hand epidemiological, clinical and experimental evidences show that mild DBT2, lesser metabolic complications and show cognitive decline incidence are *associated to well balanced*  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) intake (8,9).



**Objective:** To Study glycolipototoxicity on hippocampus. To tissue evaluate and understand the effects of  $\omega$ 6 and  $\omega$ 3 PUFAs and the antiinflammatory agent nordihydroguaiaretic acid (NDGA) effects on the etiopathology of glycolipototoxicity related to diabetic encephalopathy (DE) in a spontaneous rat diabetic model .

## MATERIALS, METHODS AND EXPERIMENTAL DESIGN

**Ethical disclosure:** animal procedures were approved by the local ethics committee (Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) and were developed according to international regulations. There is not any financial disclosure or other conflicts of interest by the authors.

**Animals and Reagents:** e-SS rats are a stable variety derived of Wistar strain characterized by Tarres and col (10,11). e-SS rats develop hipertriglyceridemia around 4<sup>th</sup> and DBT2 at 6<sup>th</sup> months of age, which is most evident in males (10,11). The study was carried out with 150 male rats being 38 healthy animals (Wistar) and 124 e-SS. Animals were kept at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  temperature,  $65 \pm 10\%$  relative humidity, and 12 h light/dark cycle. Rats were provided with food and water *ad libitum* in the animal facilities of the Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), CONICET-UNC, Córdoba, Argentina. Efforts were exerted to minimize animal suffering and to reduce the numbers of animals used.

Araquidonic Acid (AA), Nordihydroguaiaretic Acid (NDGA) and Xylenol Orange tetrasodium salt were purchased from Sigma-Aldrich® (USA). Fish oil from Natufarma Labs (Córdoba, Argentina), Glucose, total cholesterol (Chol), triglyceride (TG), glycated hemoglobin (HbA1c), C Reactive Protein (CRP) ultrasensitive, enzymes transaminases, pyruvic oxaloacetic, glutamic oxaloacetic and gamma glutamyltranspeptidase (GGT) diagnostic kits were purchased from Wiener Lab® (Argentina). Rabbit polyclonal anti-synaptophysin (SYN) antibody was purchased from Dako Biotechnology (Denmark). IL-6 plasma levels were determined by immuno ELISA kit BD Biosciences® (USA).

Fatty acids methyl ester (FAME) were identified using a commercial standard Nu-check® (USA) (12). IL-6 hippocampus levels were determined by ELISA kits purchased from R&D systems, Inc. (USA). Flow Cytometry ANNEXIN V: PE APOPTOSIS DETECTION KIT I BD

Bioscience® (USA) .Tunel S7100 | ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (German).Images were analyzed with the help of Image J 1.48 software® (USA).

**Experimental design:** All animals were administrated monthly thoroughly by twelve month by intraperitoneal (IP) route as follow 1) e-SS “diabetic control” only saline isotonic solution; 2) e-SS  $\omega$ 6 : saline with 6.25 mg of 90% araquidonc acid (AA) oil. 3) e-SS  $\omega$ 6+NDGA : saline with 6.25 mg of 90% AA oil + 1.19 mg NDGA. 4) e-SS: saline with 6.25mg of commercial fish oil containing 35% eicosapentaenoic acid (EPA) and 40% docosahexanoic acid (DHA). 5) e-SS  $\omega$ 3+NDGA: saline with 6.25mg of commercial fish oil + 1.19 mg NDGA. 6) Wistar “healthy control” (Wistar): only saline.

Groups	Treatment
1)e-SS "diabetic control".....	only saline isotonic solution
2) e-SS $\omega$ 6.....	saline with 6.25 mg of 90% AA
3) e-SS $\omega$ 6+NDGA.....	saline with 6.25 mg of 90% AA oil + 1.19 mg NDGA
4) e-SS $\omega$ 3 .....	saline with 6.25mg of commercial fish oil containing 35% eicosapentaenoic acid (EPA) and 40% docosahexanoic acid (DHA)
5) e-SS $\omega$ 3+NDGA .....	saline with 6.25mg of commercial fish oil + 1.19 mg NDGA
6) Wistar “healthy control”.....	only saline isotonic solution

To get plasma for metabolic parameters assays (glycaemia, oral glucose tolerance test (OGTT), HbA1c, TG, Chol, plasma fatty profile(FA), fasting animals were anesthetized with isoflurane and blood was centrifuged 10 min to 2.000 rpm. At 6<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> month of age rats performed a well known behavioural test,called Hole Board-Test (13).Serum markers of oxidative stress : GGTP, hydroperoxides ,lipoperoxides and nitrates, LGCI markers: CRP and Inteleukin-6 (IL-6) were determined. Brain Computed Tomography (CT), histopathological analysis and determination of apoptosis, IL-6 and SYN were carried out in dissected hippocampal tissues .

The animals were clinically evaluated daily and weighted monthly under standard conditions.

**Profile of total plasmatic FFA by gas chromatography (GC):** Plasma lipids were extracted by Folch’s method and methylated with sodium methoxide. The separation, quantification and identification of total FA methyl ester (FAME) resultants were performed using a capillary column (BPX 20m longitude, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film, SUPELCO®,

USA) in a Clarus 500© (Perkin-Elmer®) GC. The FAMEs were identified using a commercial standard (Nu-check, USA®) (12).

**Behavioural testing.** Testing were carried out at 6<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> month of age. Tests were conducted under day light between 09:00 and 15:00 h after fasting overnight from 19:00 onwards. Equipment was maintained in the same position and temperature on each occasion (13) . **Hole-Board test box.** Consist of a behavioural assay which provides three major patterns that broadly can be termed as: exploration(in motivational terms), neophilia and neophobia. Neophilia can be defined as the attraction that animals display towards an object or place because it is novel, while neophobia is the aversion that animals show towards approaching a novel object or place (14,15).The device used in present study was one modified from a previous ones by File and Wardill (13) consisting of a box (50 x50 cm), with white painted walls and floor. Four holes (2.5 cm diameter) were placed in two lines in the floor, equidistant from each other and from the walls. Each rat was positioned in the same corner. During 10-min length, the following behavioral criteria were recorded by the same observer. (I) moving time period in wandering (13-16);(II) head-dipp: the animal places its head into one of the holes, to a minimum depth such that the ears were introduced until the same level of the floor of the box (an additional bout of head-dipp was recorded if the animal raised its head fully out of the hole before resuming)(13-17); (III) rear: the animal was stationary on its back legs and raises its fore arms off the ground, extending its body vertically in bipedestation (18).

All of the following assays were carried out at 12<sup>th</sup> month of age, when DBT2 condition was fully established.

**Imaging. Computed Tomography (CT).** Brain TC images were obtained in four anaesthetized rats from each group, with a Picker scanner. Images were analyzed based on the gray scale from 0 to 5 with the help of Image J 1.48 software® (USA).

**Brain tissue sampling.** Euthanasia was performed by overdose of isofluorane, then halves brain were fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin and 6 µm slices were obtained. The other half was frozen at (-) 80°C for further studies.

Hippocampus cell isolation: Hippocampi were removed, cut into small pieces (1-2 mm<sup>3</sup>), immersed in 0.3 ml of 0.25% trypsin solution and incubated at 37°C for 30 min. The

resulting cell suspensions were filtered sequentially through 40 µm cell filters (BD Falcon®) and resuspended in PBS. Survival was assessed by supravital dye trypan blue and thus the number of cells was counted.

Blood was obtained by tail section and centrifuged 10' at 2.00G. Plasma was used by biochemical determinations and immuno ELISA for IL-6 measure.

**Histopathological analysis.** Non less than five brain were fixed in each group, processed, cut and sections stained with hematoxylin-eosin and Nissl. Twelve non serial slices 10µm thick in 10x and 40x microscopic areas of hippocampal CA1 zone were evaluated. Thickness of neurons layer and cell dispersion were recorded , being two examiners blinded to the condition and treatment of each rat brain.

**Inteleukin-6 (IL-6).** Hippocampus cells, obtained as above, and IL- 6 mRNA expression was assayed by PCR-RT. Total RNA was extracted with TRIzol ® (Life Technologies) and was quantified using a fluorometric method (The Qubit ® 2.0 Fluorometer, Life Technologies). Samples of DNA copy was amplified in triplicate with a StepOnePlus RT PCR System (Applied Biosystems). For each sample, the amount of mRNA was normalized against the bulk of mRNA of β-actin (used as reference gene).Oligonucleotide sequence was:

IL6\_FwTAGTCCTTCTACCCCAACTTCC,IL6\_RevTTGGTCCTTAGCCACTCCTTC;  
β-actin\_FwCCGCATCCTCTTCCTCCCT,β-actin\_Rev GCCACAGGATTCCATACCCAG  
(19).

## **RESULTS**

### **Plasma total fatty acids(FA) profile**

As show in Table 1 the FA profiles showed quantitative an qualitative variations among groups treatments, accordingly to the variety of PUFAs ω3 or ω6 administered (Table1).

### **Cognitive behavioural data. Hole-board test**

As show in Fig1 e-SS rats were significantly more active in the behavioural parameters than non-diabetic rats, at the 6<sup>th</sup> month of the study. When the tasks were compared , total amount of locomotion, frequency of rearing, and head-dipp at 12<sup>th</sup> month, were significantly worsened in diabetics rats. These parameters were

differentially modified in  $\omega 3$  alone and with NDGA e-SS groups. Head-dipp increased in frequency towards the end of the experiment. Values obtained by Wistar rats at 12<sup>th</sup> month remained similar to those recorded at 6<sup>th</sup> month, compared to others group. e-SS Control rats showed the poorer values. Behavioral parameters of animals treated with  $\omega 3$  alone or  $\omega 3$ +NDGA were mainly similar to those recorded in healthy Wistar rats.

### **Diagnostic Imaging by CT**

Brain e-SS rats CT showed scattered imagin of heterogeneity, similar to those usually seen in diabetics patients suffering of white matter lesions (WML) (20,21) (Fig. 2).

### **Hystopathological analisis**

Experimental animals do not showed amyloid deposits in brain tissues or vascular atherosclerotic plaques. e-SS rats white areas in brain tissue showed images consistent with scatered spongiosis and gliosis, whereas these abnormalities were not observed in Wistar rats. As shown in (Fig. 3), thickness and cell dispersion of the hippocampal CA1 zone were seen only in e-SS rats. Animals treated with  $\omega 3$  alone and  $\omega 3$  + NDGA were mainly similar to those recorded in Wistar (healthy control).

### **Apoptosis**

This analysis was performed by flow cytometry and TUNEL in dissected hippocampus. e-SS control rats had a significantly higher number of apoptosis than the other groups. Wistar (healthy control) and  $\omega 3$  group had the lowest number of apoptosis (Fig. 4).

### **Synaptophysin analisis**

Control e-SS showed lower immunomarcation for SYN. Both groups receiving NDGA and  $\omega 3$  alone groups respectively, showed values of labelling almost similar to those observed in Wistar rats (Fig. 5).

### **Oxidative stress. Gamma glutamyltranspeptidase activity**

e-SS rats showed higher levels of GGTP activity which is a suitable biomarker of oxidative stress in plasma and brain tissues. NDGA administration in both groups and in

those administered with  $\omega$ 3 only a decrement of GGTP activity in plasma ( $p < 0.05$ ) was recorded. Also,  $\omega$ 3+ NDGA group showed decreased GGTP activity in brain (Fig. 6).

### **Peroxides and nitrites**

Higher levels of plasmatic peroxides were recorded in e-SS rats, compared to Wistar. In e-SS rats treated with  $\omega$ 3+NDGA decreased hydroperoxides, lipoperoxides levels were observed.  $\omega$ 6+NDGA treatment diminished the levels of plasmatic lipoperoxides.  $\omega$ 3 treatment induced decreased levels of lipoperoxides (Fig. 7).

### **Other Inflammation Parameters**

Plasma CRP levels were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in e-SS non treated rats compared with Wistar. Both groups of animals receiving NDGA and those rats treated with  $\omega$ -3 alone, showed lower levels of CRP (Fig.8). IL-6 values were significantly increased in plasma and hippocampus in control e-SS rats. In those animals receiving only  $\omega$ 6 or  $\omega$ 3 a non significant reduction was observed, which became significant when NDGA was also added (Fig. 9).

### **Hepatic enzymes**

As a way to discard grossly perturbation in the morphology and physiology of liver we assayed plasmatic pyruvic oxaloacetic and glutamic oxaloacetic enzymes. Their levels which result within normal values and liver histopathological study showed no steatosis nor another hepatic lesion (results not shown).

## **DISCUSSION**

DBT2 is a chronic non-communicable disease whose mechanism of injury is associated with glycolipotoxicity, an abnormal condition in which excess of saturated FFAA seems to enhance apoptosis (22,23). On the contrary PUFAs generally have a protective function (24) related to their antiinflammatory and antiapoptotic action, as we confirm in present work. As observed previously by Tarres et al (10,11), e-SS rats are a suitable model for DBT2 metabolic damage related to early development of hypertriglyceridemia and subsequently hyperglycemia, whereas no development of hypertension, obesity or atheromas are seen which are common vascular factors on the development of brain injury (2,3).

In our work the e-SS rats had a progressive increment of the glycemia and HbA1c values up to six months of age which remained moderately elevated until the end of the experience.

PUFAs and NDGA treatments did not modify significantly these parameters. Nevertheless rats group treated with  $\omega$ 3 alone or  $\omega$ 3+ showed improvements on the behavior test, tomographic images, ISBG, oxidative stress and cell damage. These results could be related to a diminution on TG, inflammation, oxidative stress and apoptosis levels.

Several authors have been demonstrated an association between lipotoxicity and DBT2 (1,4-7). In this context our results are in agreement with these researchers since PUFAs  $\omega$ 3 treatment ameliorate associated parameters related to the DBT2 pathology.

These data reinforce the importance of the dietary fats as risk factors associated with the initiation and progress of DBT2.

Our results and other studies support that DBT2 is a *plurimetabolic* disease.

Hence, behavioral abnormalities recorded in our experiments showed that brain illness, diabetic encefalopathy (DE), seems mainly related to DBT2 metabolic disorders (1,4).

Desaturase activity for FFAA is affected in DBT2 animals and humans (25). This alteration could partly explain the differences observed (Table1) in the levels of the fatty acids families in plasma lipid profiles of control-SS and Wistar groups as well as the changes induced by  $\omega$ 3 or  $\omega$ 6 PUFAs administration.

When cognitive behaviour was analysed by of the Hole Board- test e-SS diabetics rats were more active than non-diabetic in the first weeks, a finding previously described in diabetic mice by Toth and col. (19).Hypermotility and hyperphagia may be linked to hunger hyperphagia of glucose thus contributing to increased exploratory actions. Slowing and less neophilia, evaluated through three parameters of behaviour as "Head dipping", "Time Movement" and "Rearing" were also different among group. Spontaneously rear on their hind legs is an appropriate marker of environmental novelty(18). Integrity of hippocampal nuclei is a crucial component of the central nervous system (CNS), controlling rearing in challenging novel environments(15,18). Head dipping is related to spatial information processing (16), exploratory behaviour and neophilia (14).Moving is associated with a motor intact system, specially with motivational-behavioral stimuli, functional plasticity processes which have origin on the dentate gyrus (17).In our work most of e-SS animals diminished these abilities along the experimental time being these abnormalities more evident in non treated control e-SS animals. Interestingly, performance of animals treated with  $\omega$ 3+NDGA were closer to the behaviour of healthy Wistar rats (Fig.1).

Hippocampus combine sensory afferents and synaptic mechanisms underlying certain types of fast learning as well as establishing links to motivational, emotional, executive, and sensomotor functions (26). Geriatrician focused on the care of people with DBT2 frequently see that patients with long-standing DBT2 change their usual behavior, showing difficulties in learning and progressive apathy a scenario that becomes difficult to differentiate from depression. These changes are similar to those observed in our animals being our results in agreement with those by Zhao et al who observed in diabetic rats deficit of learning, memory which related to increased oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and CNS cell apoptosis (27). Whays et al made similar observations in diabetic rats, also finding altered behavior they cataloged as depression and oxidative stress in diabetic animals(28).

Diagnostic imaging by TC showed areas of WML in our diabetic rats, lesions which were not observed in Wistar rats. These alterations were more evident in control e-SS and unexpectedly in a certain degree in AA groups; as well VML were less severe in animals *who received NDGA+  $\omega$ 6 or  $\omega$ 3+ NDGA or only  $\omega$ 3* (Fig. 2). These results indicate that plus antiinflammatory agents  $\omega$ 3 *per se* protect brain for DE damage. Beside it seems that in DE this deleterious process, LGCI plays a key role, since it was prevented by NDGA. The relevance and specificity of scattered areas of WML appears to be more accentuated in e-SS non treated rats at 12<sup>th</sup> month of age, when DBT2 condition was fully established. Neuroimaging obtained in this work gives strong anatomical comparative evidences similar to those observed in elderly DBT2 patients, as lacunar infarcts and cortical atrophy (19,21),so giving further explanation for the cognitive decline seen in human diabetics.

Histopathological abnormalities as structural dispersion of neurons layers, cytoplasmic vacuolization, spongiosis, gliosis (Fig.3) and apoptosis(Fig.4) were observed at hippocampus specially on the dentate gyrus and CA1 zones as previously described in rats by Amin S et al (29). Interestingly, cytoplasmic neuron vacuolization, a known but not understood phenomenon in DE could be associated with the ER stress, as suggested by Zhao et al (27). The presence of abnormal cellular dispersion led us to consider synapses damaging associated with ED as it is seen in Alzheimer disease whereas pyramidal layer CA1zone thickness may be related to increased apoptosis.

Synapse damage is a key progressive lesion in dementia (30). Synaptophysin(SYN) a crucial presynaptic protein immunolocalization, also decreased in the diabetic rats



compared with age-matched control rats (31). SYN and synapses are affected in disbalanced neuronal metabolism (32). Immunostaining of SYN was less evident in control e-SS as well as in animals treated with AA whereas animals administered with  $\omega$  3PUFAs, with and without NDGA, showed marcation similar to Wistar rats (Fig 6). So, synapse preservation may be a beneficial effects of the combination of  $\omega$  3PUFAs and NDGA treatment, in this model. Besides, IL-6 were elevated giving support to observed gliosis and apoptosis and LGCI state (Fig.4).Actually, plasmatic values of CRP and IL-6 were elevated (Fig.8 and 9). Taken as whole our results are in agreement, and go further, to studies showing a pathophysiological association between LGCI and progressive brain damage in elderly DBT2 (33,34). Another pathophysiological recorded alteration which support the above conclusion were the elevated GGTP values in plasma and brain (Fig.6).Values of hepatic enzymes were normal discarding significant liver damage associated with high lipo ,hydroperoxides and nitrites values (Fig.7) .All of them are reliable markers of cellular oxidative stress. Indeed, these are important and frequent mechanisms of DBT2 complications (35), even in prediabetic state (36) ,associated with neuronal metabolic dysfunction (37),DNA damage and apoptosis (38,39). So, nutrients as  $\omega$  3 may play a promisory protective role to control oxidative damage in CNS of elderly DBT2 subjects (40,41).

As known, DE pathophysiology is related to insulin resistance, glicolipototoxicity, inflammation and oxidative stress, which likely may trigger a misbalanced activation of AKT enzyme pathway (42). The observed improvement in e-SS rats by the addition with  $\omega$  3 PUFAs would be associated with better insulin-sensitive mechanism either by the increase of the IP3, the natural AKT activator and /or the ability of  $\omega$  3 PUFAs, mainly DHA, to bind to nuclear peroxisome proliferator activated receptors (PPAR  $\alpha$  and PPAR  $\gamma$ ) hence in turns improving learning and memory (42,43).

There is increasing evidence that cytokine-induced response, linked to LGCI state, are closely involved in the pathogenesis of DBT2 ,condition in which elevated circulating inflammatory markers such as CRP and interleukin-6 predict the development of DBT2 and associated complications (44).In our e-SS model LGCI significantly increased with age as we saw through elevated CRP plasma levels (Fig.8) as well as increased levels of IL-6 in plasma and hippocampus tissues (Fig.9).Interestingly, in e-SS rats  $\omega$ 3 PUFAs and NDGA decreased these LGCI markers.

Taken as a whole we observed in our diabetic rats a strong link among oxidative stress, inflammation and their impact on histopathological abnormalities ,apoptosis, spongiosis, structural dispersion thus precluding the clinical complication of ED in elderly subjects.

In short,  $\omega$ 3 PUFAs and NDGA protect diabetic brain in elderly diabetic rats and may be an open way to prevent DE complications in patients.

### **Conclusions**

Neurocognitive, behaviour, laboratory and morphological perturbations observed in this model (e-SS rat) are compatible with DE in aging animals. Our results underlying pathophysiology of DE, wich is associated with glicolipototoxicity, inflammation and high oxidative stress markers. Animals treated with  $\omega$ 3 + NDGA showed improvement of these parameters, approaching to the values observed in healthy controls ( Wistar ).So combination of  $\omega$ 3 plus natural antiinflammatory xenobiotics as NDGA obtained from native plants, could be a therapeutical tool in the prevention and treatment of DE .

### **GLOSSARY:**

- AD: Alzheimer Disease
- AA: Araquidonc acid
- Ch: Cholesterol
- CT: Computed Tomography
- CNS: Central Nervous System
- COX: Cyclooxygenase
- CRP: Plasmatic C reactive protein
- DBT2: Diabetes Mellitus Type 2
- DHA: Docosahexaenoic Acid
- DE: Diabetic Encephalopathy
- DM: Diabetes Mellitus
- ER: Endoplasmic Reticulum
- EPA: Eicosanopentanoic Acid
- eSS rats: Stillman Salgado Rats
- FA: plasma fatty profile
- FBG: Fasting blood glucose
- Fig:Figure

- FFA: Free fatty acid
- GLC: Gas Chromatography
- GGT: Plasmatic Gamma Glutamyl Transpeptidase
- HbA1c: Glycosylated hemoglobin
- HT: Hole Test
- IP: Intraperitoneal Route
- LGCI: Low grade chronic inflammation
- MUFAs: Monounsaturated fatty acid
- NDGA: Nordihydroguaiaretic acid
- OGTT : Oral glucose tolerance test
- PA: Palmitic acid
- PBG: Postprandial blood glucose
- PUFAs: Polyunsaturated fatty acid
- SYN : Synaptophysin
- SFA: Saturated fatty acid
- TG: Triglycerides
- WML: White Matter Lesions

## **Bibliography**

- 1.-Nowlin SY, Hammer MJ, D'Eramo Melkus G. Diet, inflammation, and glycemic control in type 2 diabetes: an integrative review of the literature. *J Nutr Metab.* 2012;2012:542698.
- 2.- Kim HY, Goo JH, Joo YA, Lee HY, Lee SM, Oh CT, Ahn SM, Kim NH, Hwang JS. Impact on inflammation and recovery of skin barrier by nordihydroguaiaretic Acid as a protease-activated receptor 2 antagonist. *Biomol Ther (Seoul).* 2012 :463-9.
- 3.-Díaz-Gerevini GT, Repposi G, Dain A, Tarres MC, Das UN, Eynard AR. Cognitive and motor perturbations in elderly with longstanding diabetes mellitus. *Nutrition*, 2014 ;30:628-35
- 3.-Camps J, García-Heredia A Introduction: Oxidation and Inflammation, A Molecular Link Between Non-communicable Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2014;824:1-4.
- 4.-Vincent Poitout, Julie Amyot, Meriem Semache, Bader Zarrouki, Derek Hagman, and Ghislaine Fontes Glucolipotoxicity of the Pancreatic Beta Cell *Biochim Biophys Acta.* Mar 2010; 1801: 289–298.
- 5.- Mir SU, George NM, Zahoor L, Harms R, Guinn Z, Sarvetnick NE.

Inhibition of Autophagic Turnover in  $\beta$ -cells by Fatty acids and Glucose leads to

Apoptotic cell Death. J Biol Chem. 2014. pii: jbc.M114.605345.

6.- Hee Ra Park, Ji-Young Kim, Kun-Young Park, and Jaewon Lee Lipotoxicity of Palmitic Acid on Neural Progenitor Cells and Hippocampal Neurogenesis Toxicol Res. 2011; 27: 103–110.

7.- Perez-Martinez P, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. n-3 PUFA and lipotoxicity Biochim Biophys Acta. 2010;1801:362-6.

8.- Jafari T, Fallah AA, Azadbakht L. Role of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review of epidemiological and clinical studies. Maturitas. 2013 ;74:303-8.

9.- Panza F, Frisardi V, Seripa D, Imbimbo BP, Sancarlo D, D'Onofrio G, Addante F, Paris F, Pilotto A, Solfrizzi V. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment, and dementia. Curr Alzheimer Res 2011 ; 8:492-509.

10.- Daniele SM, Montenegro SM, Tarres MC, Picena JC, Martinez SM.

The eSS rat, a nonobese model of disordered glucose and lipid metabolism and fatty liver.

Daniele SM, Montenegro SM, Tarres MC, Picena JC, Martinez SM. Diabetol Metab Syndr. 2010 ; 17;2:15.

11.-Tarres MC, Martinez SM, Montenegro S, Llorens A, Picena JC, Naves A. The e-SS rat. A model of non-insulin-dependent human diabetes. Amer J Pathol 1992;141:761–3.

12.- Andrea Comba, Damian M Maestri, María A Berra, Carolina Paola Garcia, Undurti N Das, Aldo R Eynard, and María E Pasqualini Effect of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. Lipids Health Dis. 2010; 9: 112.

13.-File S.E., Wardill A.G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. Psychopharmacology. 1975;44:53–59.

14.- Greenberg R. The role of neophobia and neophilia in the development of innovative behaviour of birds. In: Reader S.M., Laland K.N., editors. Animal Innovation. Cambridge University Press; Cambridge: 2003. pp. 175–196.

15.- Brown G R and Nemes C The *exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus*: is heading-dipping a valid measure of neophilia? Behav Processes. 2008 ; 78: 442–448.

16.- Saiyudthong S, Marsden C A. Acute effects of bergamot oil on anxiety-related behaviour and corticosterone level in rats. Phytother Res. 2011 ;25:858-62.

17.- Almaguer-Melian W, Bergado J A, López-Rojas J, Frey S, Frey JU. Differential effects of electrical stimulation patterns, motivational-behavioral stimuli and their order of application on functional plasticity processes within one input in the dentate gyrus of freely moving rats in vivo. Neuroscience. 2010 ;165:1546-58.

18.-Lever C, Burton S, O'Keefe J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. Rev Neurosci. 2006;17:111-33.

19.- Toth C, Schmidt AM, Tuor UI, Francis G, Foniok T, Brussee V, Kaur J, Yan SF, Martinez JA, Barber PA, Buchan A, Zochodne DW. Diabetes, leukoencephalopathy and rage. Neurobiol Dis. 2006 ;23:445-61.

20.- Barbera van Harten, Frank-Erik de Leeuw, Henry C. Weinstein, Philip Scheltens, and Geert Jan Biessels. Brain Imaging in Patients With Diabetes A systematic review. Diabetes Care November 2006. 2539-2548

21.- Nelson P. T., Smith Ch. D., Abner E A., Schmitt F A, Scheff S W, Davis G J, Keller J N, Jicha G A, Davis D, Wang-Xia W, Hartman A, Katz D G, and Markesber WR Human cerebral neuropathology of Type 2 diabetes mellitus. Biochim Biophys Acta. 2009; 1792: 454–469.

22.- Poitout V and Robertson RP Glucolipotoxicity: Fuel Excess and  $\beta$ -Cell Dysfunction Endocrine Reviews . 2008. 3. 351-366

- 23.-Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on  $\beta$ -cell turnover and function. *Diabetes* 2001 50:69–76
- 24.- Wei D, Li J, Shen M, Jia W, Chen N, Chen T, Su D, Tian H, Zheng S, Dai Y, Zhao A. *Diabetes*. Cellular production of n-3 PUFAs and reduction of n-6-to-n-3 ratios in the pancreatic beta-cells and islets enhance insulin secretion and confer protection against cytokine-induced cell death. 2010 ;59:471-8.
- 25.- Imamura S, Morioka T, Yamazaki Y, Numaguchi R, Urata H, Motoyama K, Mori K, Fukumoto S, Shoji T, Emoto M, Inaba M. Response to comment on Imamura et al. Plasma polyunsaturated fatty acid profile and delta-5 desaturase activity are altered in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2014;63:1432-8.
- 20/26.- Bast T. Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior. *Rev Neurosci*. 2007;18:253-81.
- 27.- Zhao Y, Yan Y, Zhao Z, Li S, Yin J. The dynamic changes of endoplasmic reticulum stress pathway markers GRP78 and CHOP in the hippocampus of diabetic mice. *Brain Res Bull*. 2014; 18. pii: S0361-923000195-6.
- 28.- Wayhs CA, Mescka CP, Guerreiro G, Moraes TB, Jacques CE, Rosa AP, Ferri MK, Nin MS, Dutra-Filho CS, Barros HM, Vargas CR. Diabetic encephalopathy-related depression: experimental evidence that insulin and clonazepam restore antioxidant status in rat brain. *Cell Biochem Funct*. 2014 ;32:711-9.
- 29.- Amin S N, Younan SM , Youssef M F, Rashed L A , and Mohamady I A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats Published online, 2013. doi: 10.12688/f1000research.2-151.v1
- 30.- Lee SH, Sharma M, Südhof TC, Shen J. Synaptic function of nicastrin in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 17;111:8973-8.
- 31.- Smith TD, Adams MM, Gallagher M, Morrison JH, Rapp R. Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *Neuroscience* 2000; 12 . 6587-6593
- 32.- Wang J Q, Yin J, Song Y F, Zhang L, Ren Y X, Wang DG, Gao LP, and Jing Y H .Brain Aging and AD-Like Pathology in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats *J Diabetes Res*. 2014; 2014: 796840.
- 33.-Dheen ST, Kaur C, Ling EA Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem*. 2007;14:1189-97
- 34.- Krause D L and Müller N Neuroinflammation, Microglia and Implications for Anti-Inflammatory Treatment in Alzheimer's Disease *Int J Alzheimer Dis*. 2010; pii: 732806. doi: 10.4061/732806.
- 35.- Forbes J.M. and Cooper M.E. Mechanisms of Diabetic Complications *Physiol Rev*. 2013; 93:137-188
- 36.- Pereira CS, Molz P, Palazzo RP, de Freitas TA, Maluf SW, Horta JA, Prá D, Franke SI DNA damage and cytotoxicity in adult subjects with prediabetes *Mutat Res*. 2013 .15;753:76-81.
- 37.-Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, Singh LP. Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: implications for diabetic retinopathy. *Exp Cell Res*. 2013. 15;319:1001-12.
- 38.- de la Monte SM, Tong M. Brain Metabolic Dysfunction at the Core of Alzheimer's Disease *Biochem Pharmacol*. 2013. 28.pii: S0006-2952(13)00796-X.
- 39.-Kapoor R, Kakkar P Protective role of morin, a flavonoid, against high glucose induced oxidative stress mediated apoptosis in primary rat hepatocytes. *Kapoor R, Kakkar P. PLoS One*. 2012;7:e41663
- 40.-Müllner E, Brath H, Pleifer S, Schiermayr C, Baierl A, Wallner M, Fastian T, Millner Y, Paller K, Henriksen T, Poulsen HE, Forster E, Wagner KH. Vegetables and PUFA-rich

plant oil reduce DNA strand breaks in individuals with type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res.* 2013 ;57:328-38.

41.-Mitjavila MT, Fandos M, Salas-Salvadó J, Covas MI, Borrego S, Estruch R, Lamuela-Raventós R, Corella D, Martínez-Gonzalez MÁ, Sánchez JM, Bulló M, FitóM, Tormos C, Cerdá C, Casillas R, Moreno JJ, Iradi A, Zaragoza C, Chaves J, Sáez GT. The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial. *Clin Nutr.* 2013 ;32:172-8.

42.- Sun LJ, Hou XH, Xue SH, Yan F, Dai YJ, Zhao CH, Wang F, Yang RH.

Fish oil modulates glycogen synthase kinase-3 signaling pathway in diabetes-induced hippocampal neurons apoptosis. *Brain Res.* 2014; 29;1574:37-49.

43.- Hajjar T, Meng GY, Rajion MA, Vidyadaran S, Othman F, Farjam AS, Li TA, Ebrahimi M. Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ ) gene expression in rats. *BMC Neurosci.* 2012 18;13:109.

44.- John C. Pickup J C Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes *Diabetes Care* 2004 27 ,3: 813-823

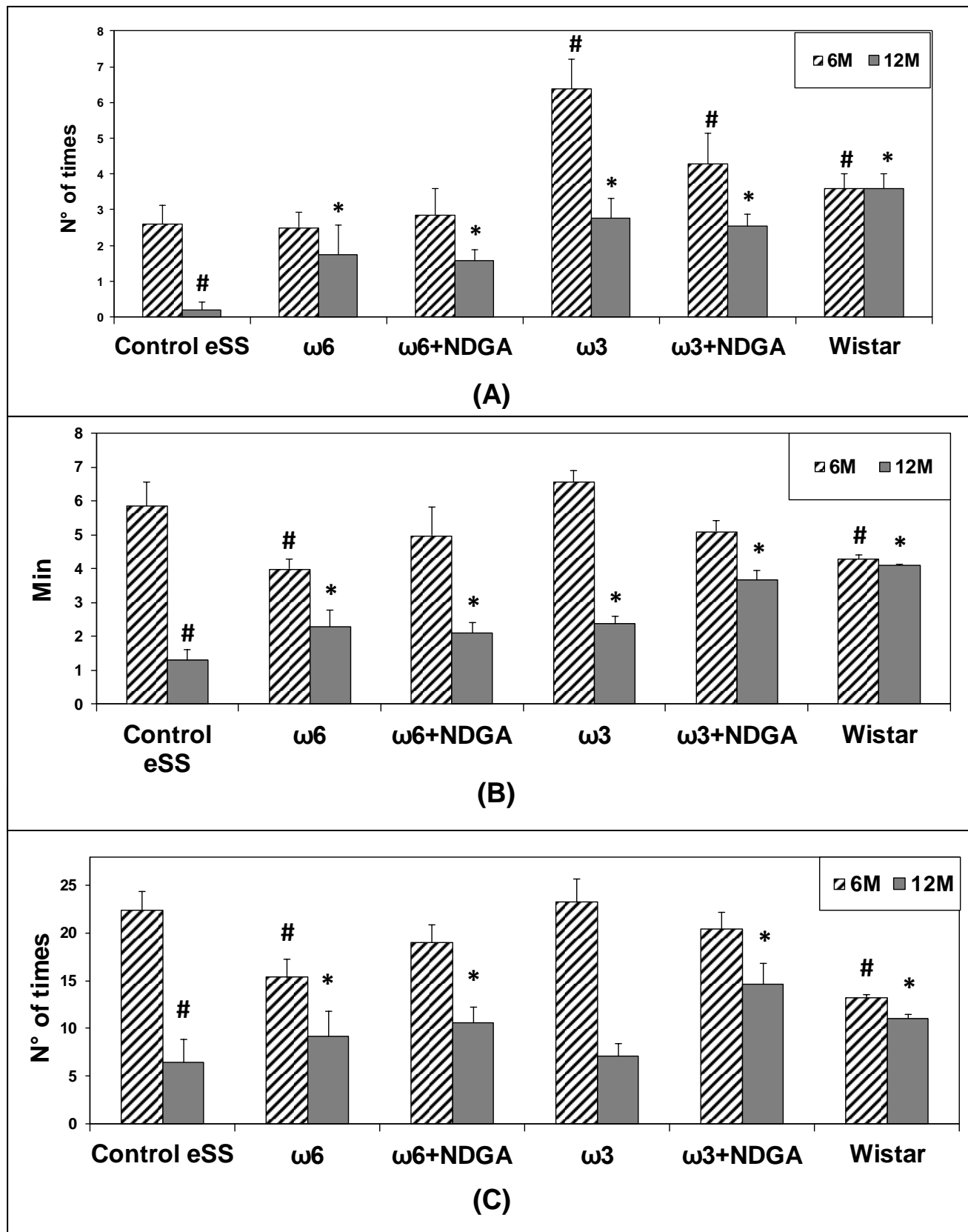
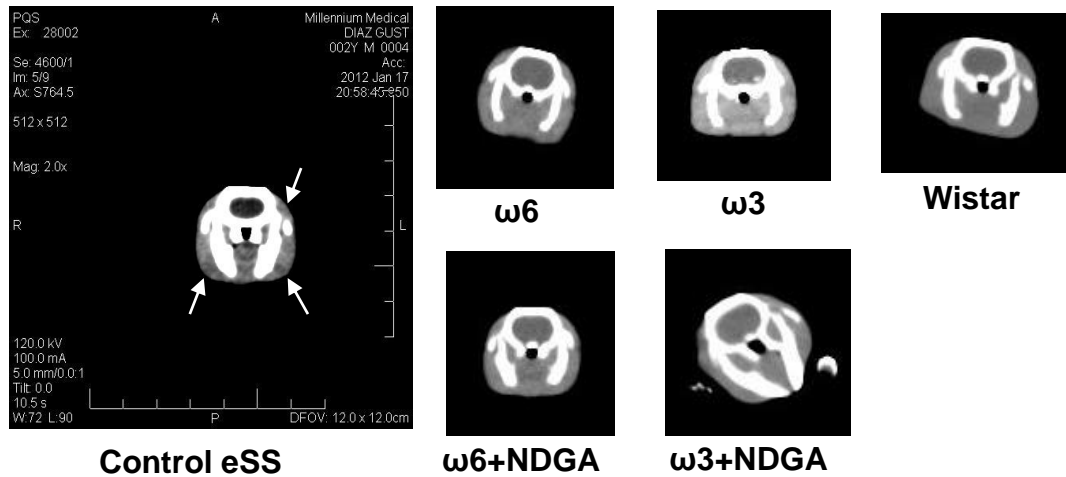
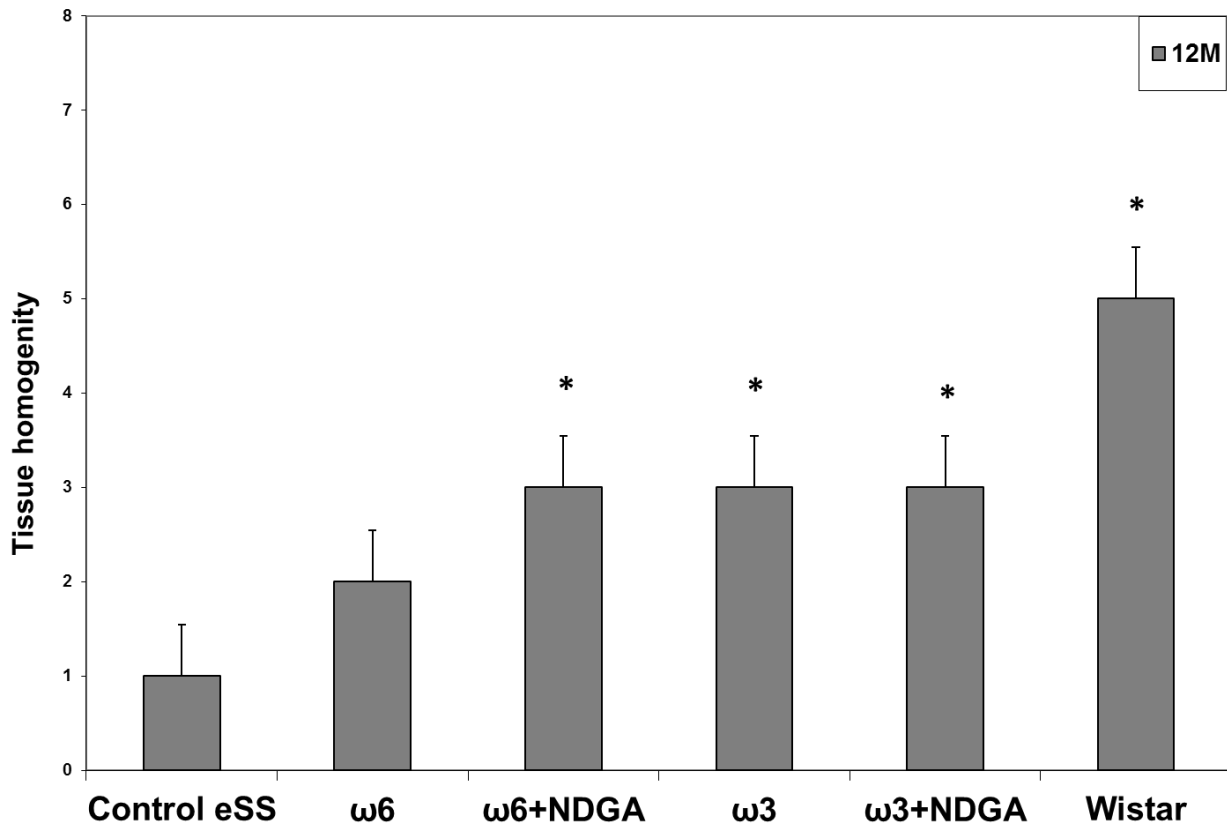


Figure 1: **Behaviour Evaluation by Hole Board Test:** (A) Head deeping, (B) Time Movement and (C) Rearing. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. # Indicate significant difference to Control e-SS at 12 month,  $p \leq 0.05$ . \* Indicate significant difference to Control e-SS at 12 month,  $p \leq 0.05$ . Nomenclatures see Table1.



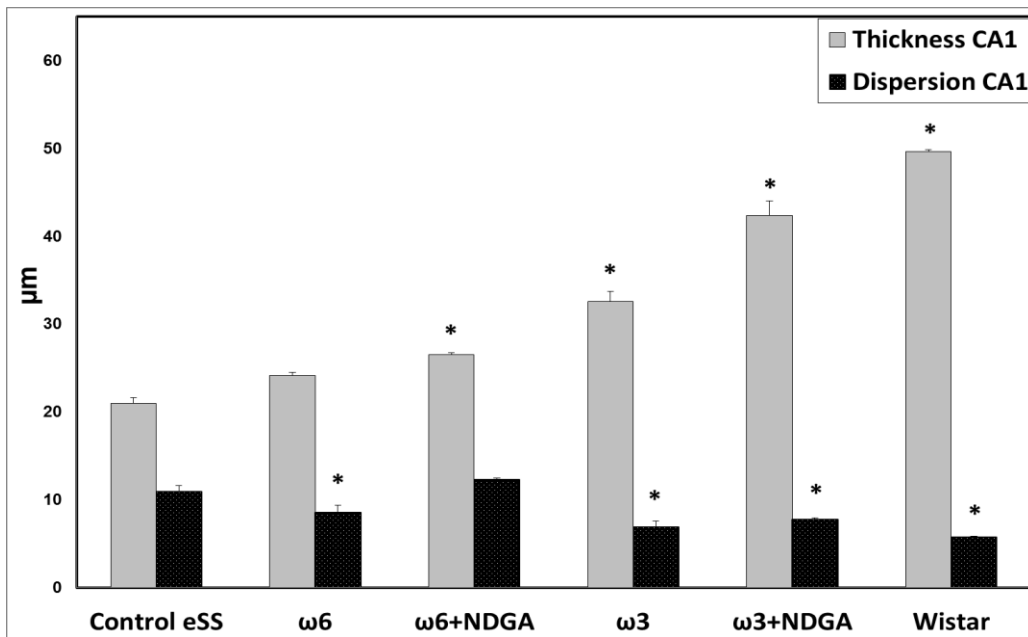
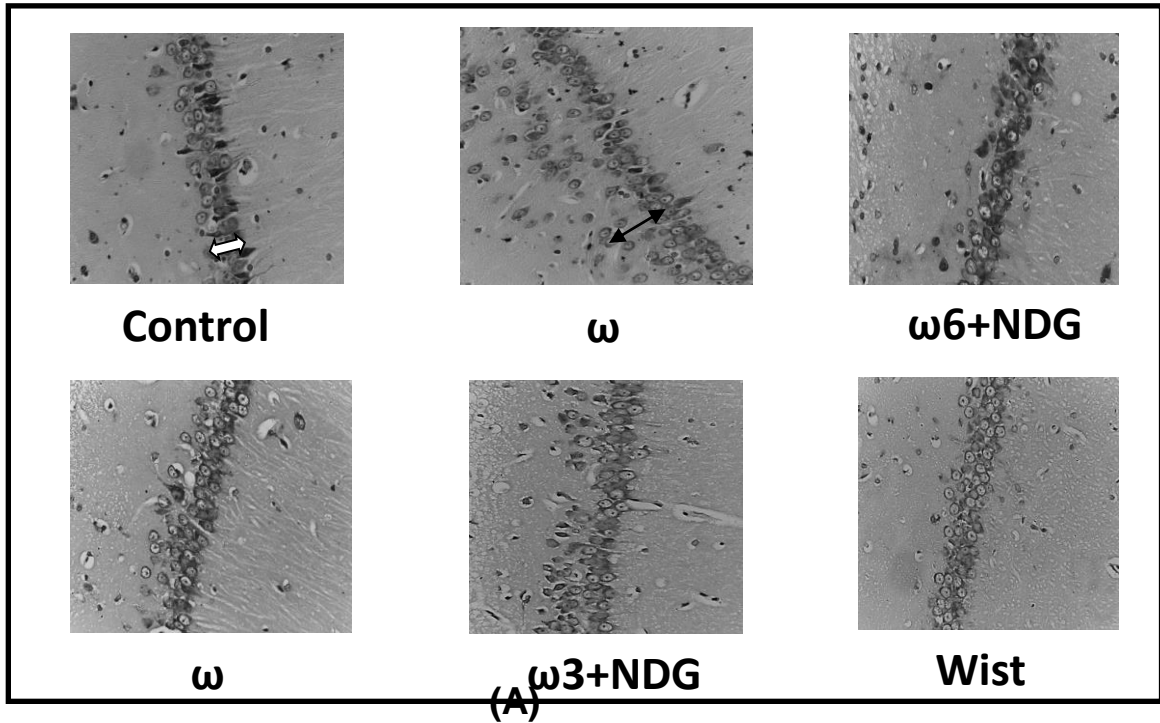
(A)



(B)

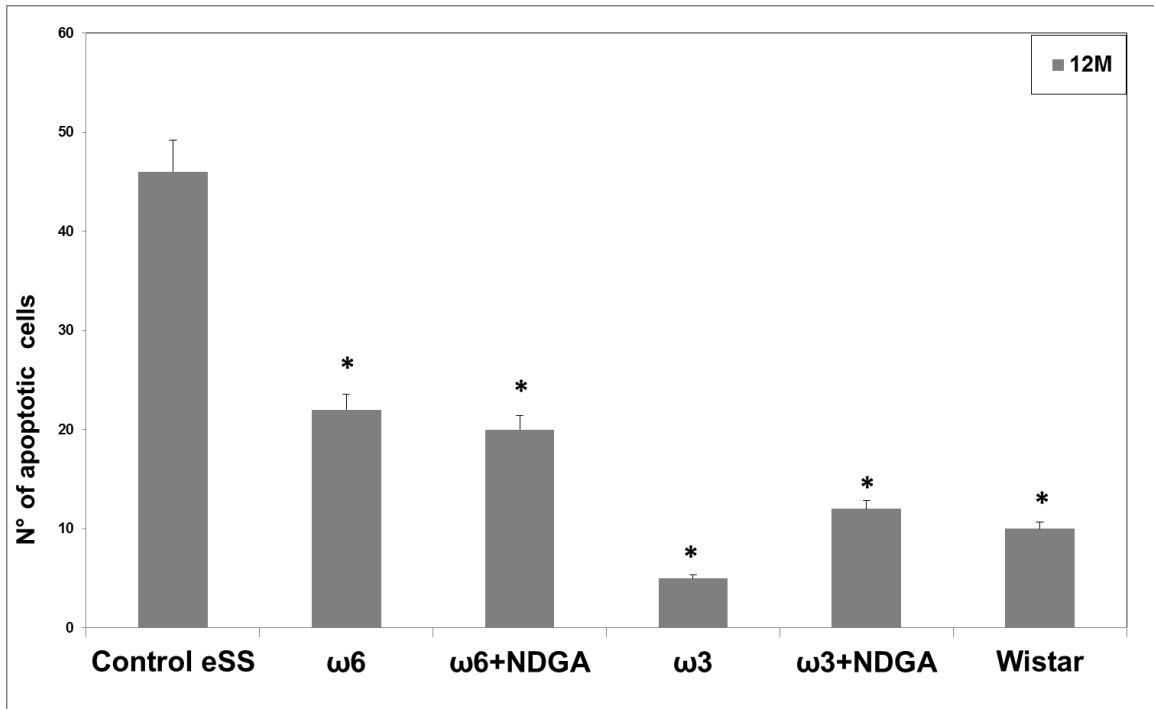
Fig 2. (A) **Computed Tomography Images**. Arrows indicate zones of tissular heterogeneity.(B) Densitometry of tissue homogeneity of brain rats CT images. \* Indicate significant difference to Control e-SS at 12 month,  $p \leq 0.05$ . Nomenclatures see Table1.



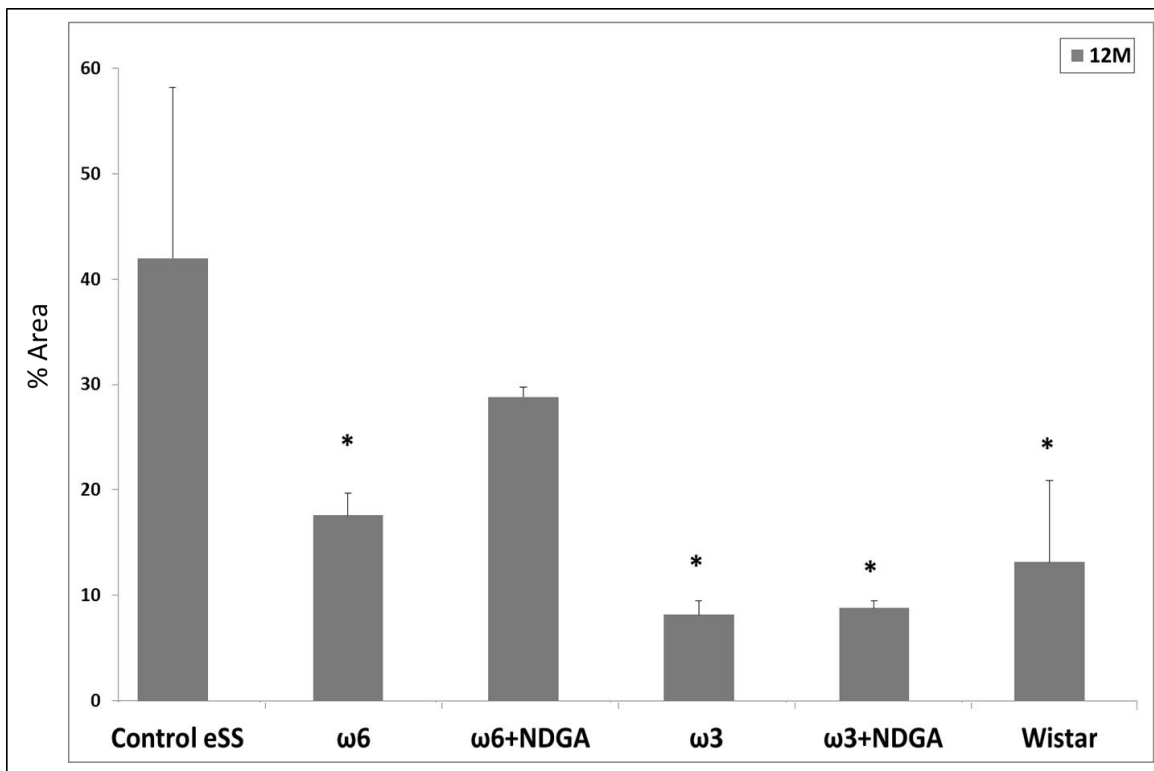


(B)

Figure 3: (A) Cell dispersion (black arrow )and thickness(white arrow) of the hippocampal CA1-4 zone, at 12 months of aging.Nissl 40x.(B) Histopathological analysis.Data are expressed as mean  $\pm$  SEM\* Indicate significant difference to Control e-SS at 12 month,  $p \leq 0.05$ . Nomenclatures see Table1.



(A)



(B)

Figure 4: Hippocampal apoptosis in animals at 12 months (A) by flow cytometry, (B) by TUNEL. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* Indicate significant difference to Control eSS,  $p < 0.05$ . Nomenclatures see Table 1.

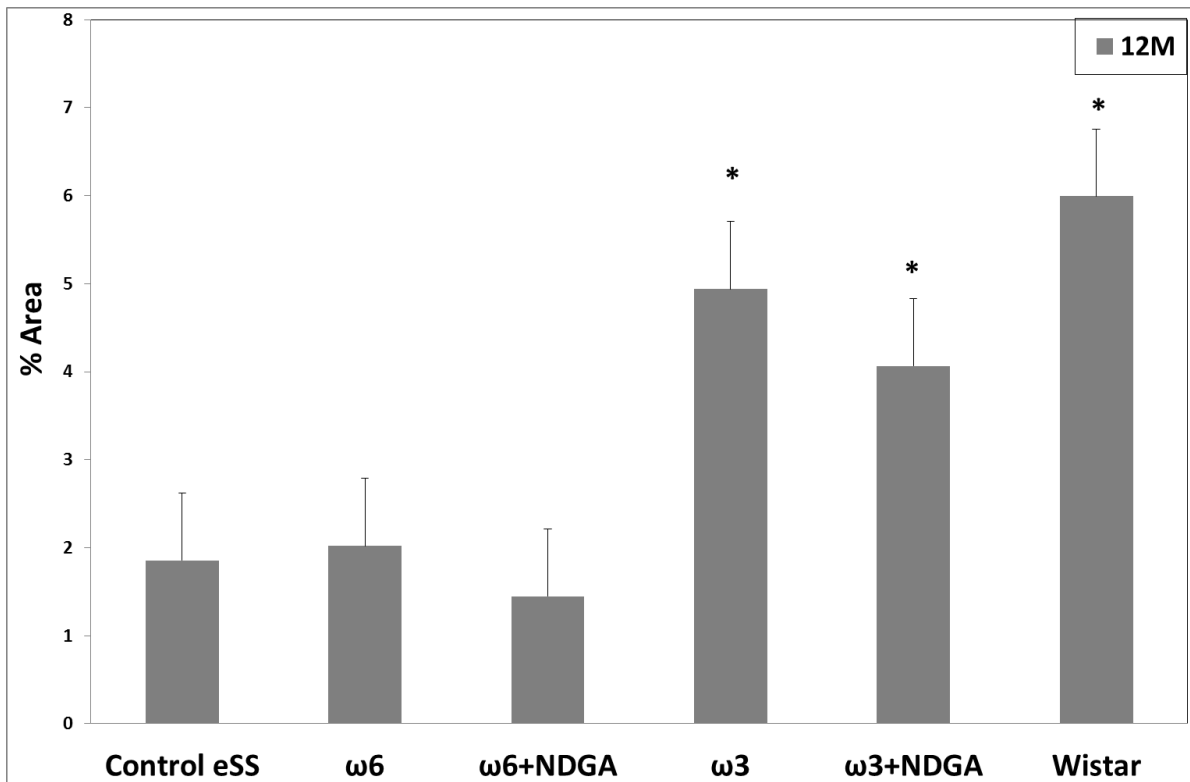


Figure5: Synaptophysin analysis by immunohistochemical staining. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* Indicate significant difference to Control eSS,  $p \leq 0.05$ . Nomenclatures see Table1.

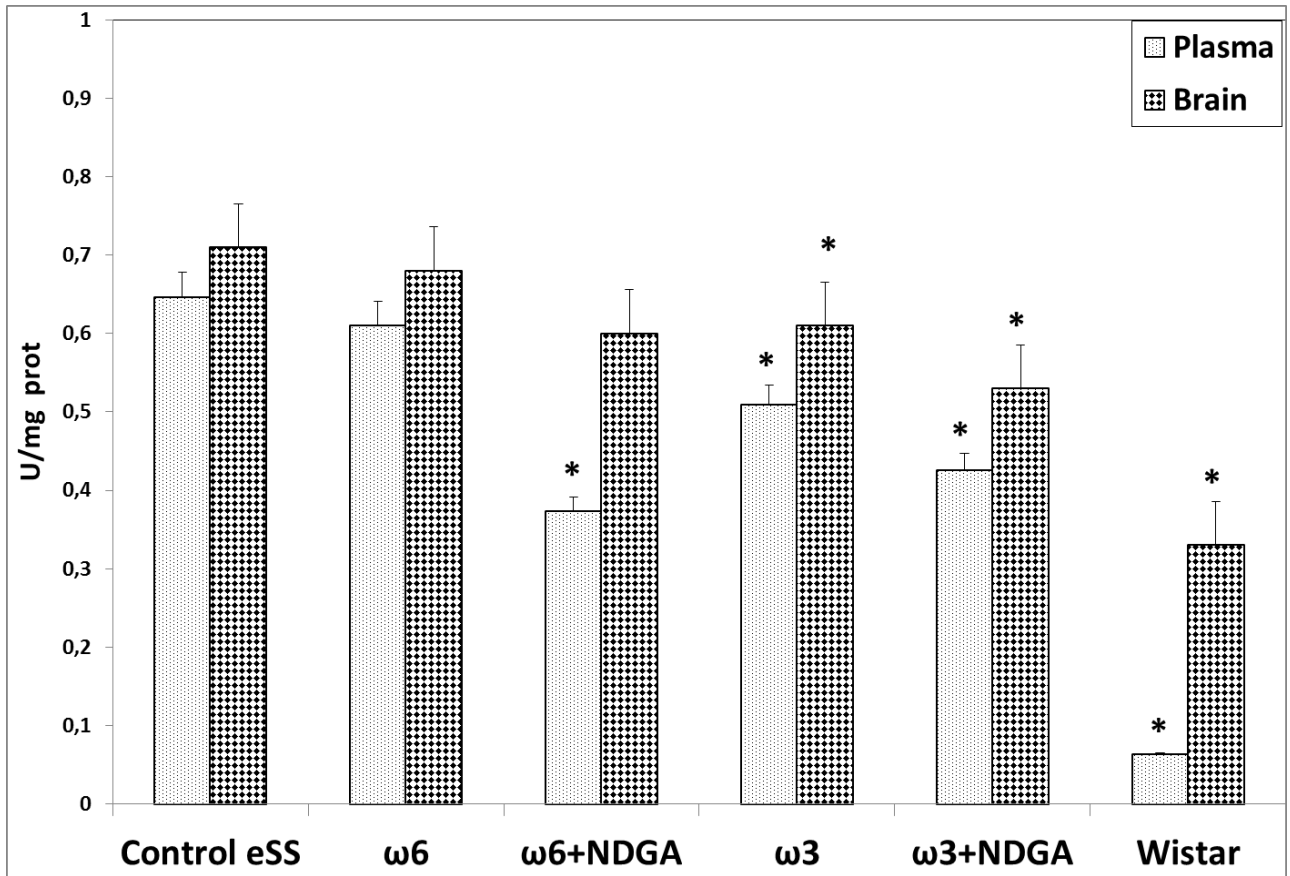
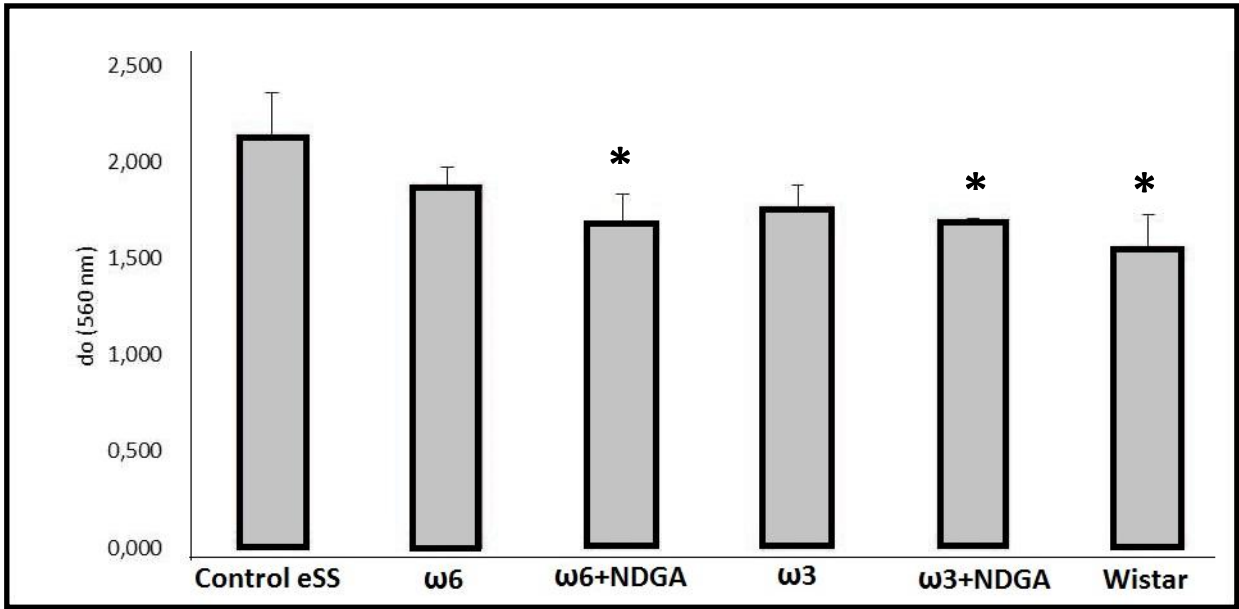
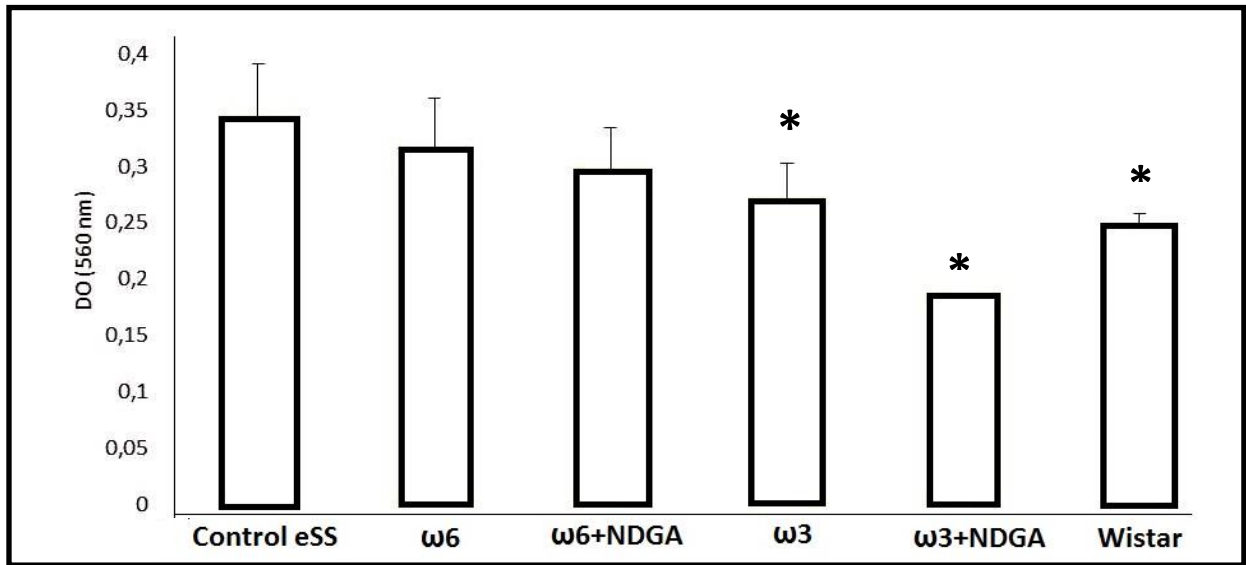


Figure 6: GGTP enzyme activity measured in plasma and brain tissue of animals at 12 months. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* Indicate significant difference to Control eSS,  $p \leq 0.05$ . Nomenclatures see Table 1.



(A)



(B)

Figure7:Plasmatic (A) Lipoperoxides , and (B) Hydroperoxides assay of animals at 12 months. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* Indicate significant difference to Control eSS,  $p \leq 0.05$ . Nomenclatures see Table1.

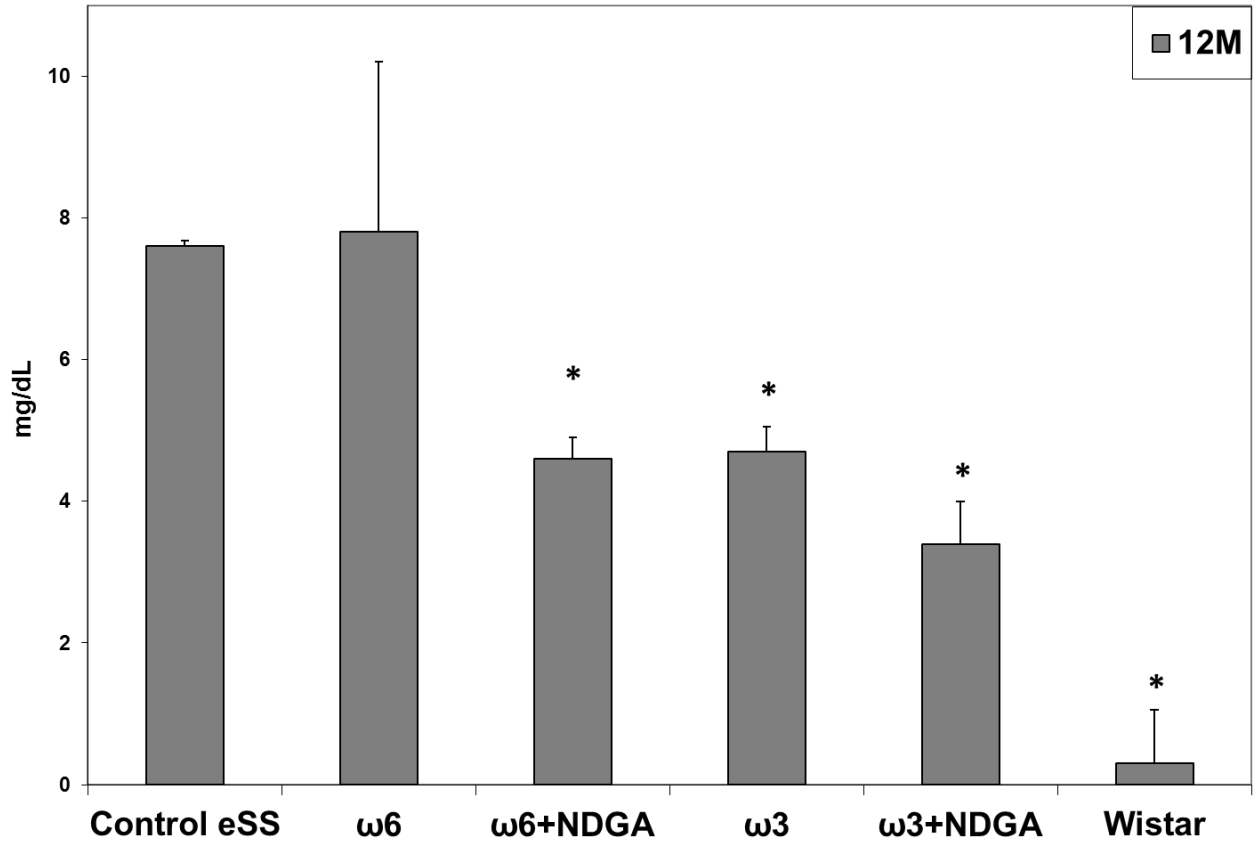


Figure 8: Levels of plasmatic CRP of animals at 12 months. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* Indicate significant difference to Control e-SS,  $p \leq 0.05$ . Nomenclatures see Table1.

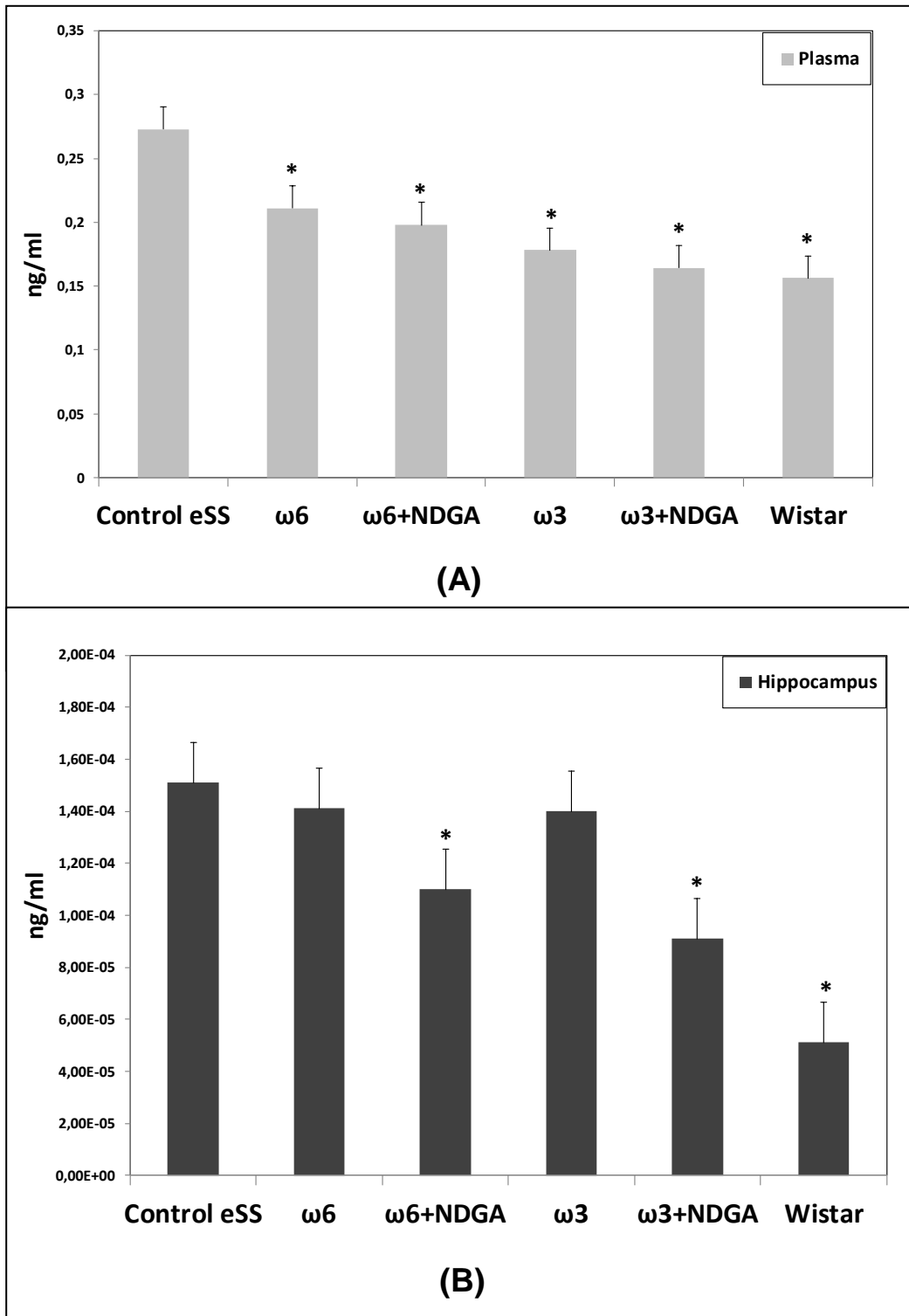


Figure 9: Levels of IL6 in (A) plasma and (B) hippocampus of animals at 12 months. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* Indicate significant difference to Control e-SS,  $p \leq 0.05$ . Nomenclatures see Table1.

## **APENDICE 3**

### **“Programa Aprendiendo a Vivir”**

Programa de extensión de la Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (FCAM-UNC) y la Fundación Grupo de Amigos de los Diabéticos de Villa Carlos Paz Personería 231 –Federación Argentina de Diabetes-Federación Internacional de Diabetes [www.fgad.org.ar](http://www.fgad.org.ar)

#### **Destinatarios:**

Personas de la comunidad de Villa Carlos Paz, diabéticos y adultos mayores

#### **Equipo a Cargo**

Mgter Gustavo T Díaz, Dra Patricia Quiroga, Prof Dr Gastón Reossi, Alejandro Dain, Prof Dra María Eugenia Pasqualini, Dra Cristina Beatriz Lopez, Sr Orlando baigorria, Sra Carmen Camino y Prof Dr Aldo Eynard

#### **Estructura del programa**

#### **Fundamento teórico**

Vivir implica una adaptación permanente ante los cambios bio-psíquicos y sociales de la persona y su comunidad. Esto condiciona un envejecimiento cronológico, biológico y social. Una adecuada adaptación y solución a los problemas marcará la calidad de vida de la persona. Los adultos mayores tienen un aumento en la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles, hipertensión arterial 70%, diabetes 20%, demencia del 10% Estas cifras se relacionan con los datos del estudio Deán Funes para HTA se detectó en personas de 60 o más años en el sexo Femenino un 75% y en el masculino un 60 %, diabetes.6,3% y obesidad 42,1% .En el Estudio Nahnes detectan una cifra del 74 % de hipertensos , 67.8% con intolerancia a la glucosa o diabetes y obesidad un 55% en personas mayores de 60 años.El estudio PRESEA (prevención secundaria en la Argentina) informó que el 45.5 % de la personas hipertensas tenían cifras tensionales no controladas(>140/90),43% eran sedentarios, el 27 % eran diabéticos y el 22,7% obesos.La necesidad de redes sociales y educación para la salud constituyen necesidades prevalentes en esta población. Se plantea un abordaje transdisciplinario con foco y eje en la persona, centrado en la educación para la salud, la nutrición, la actividad física , la construcción de redes sociales y el fomento de la solidaridad. Así se creó el siguiente programa en base a la literatura internacional, experiencias realizadas en el país y en el Instituto Nacional de Ciencias de la Salud (INICSA CONICET-UNC), la Cátedra de Histología, Embriología y Biología Celular FCM-UNC. En un marco de



empoderamiento de la problemática por parte de los interesados y aplicación de los principios de la epidemiología comunitaria según las enseñanzas del prof Gianni Tognoni con la participación de los pacientes.

## **OBJETIVO GENERAL**

Capacitar a las personas con diabetes y procesos asociados, a sus familiares y a la población en general

## **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

Educativos:

-Brindar los conocimientos necesarios en: Hipertensión, Diabetes, Sedentarismo, Obesidad, Deterioro Cognitivo, Infecciones Prevalentes, Cáncer, Insuficiencia renal.

-Adquirir la capacidad para resolver situaciones problemáticas

Médico-Biológicos:

-Lograr un estilo de vida activo físico y mental

Sociales:

-Conformar redes de ayuda mutua

- Aumentar la participación en actividades físicas y recreativas

Psicológicos:

-Crear redes sociales y -Acompañamiento

## **Metas**

En el curso de 6 meses

Lograr saber: Tomar Tensión Arterial / Pulso/Glucemia

Tener una dieta equilibrada

Hacer 30 minutos de actividad física diaria y tener actividad mental frecuente

Responder a un cuestionario mínimo

## **Metodología**

1-Seminarios-Taller:

2-Actividad Física-Tekwondo-Programa Armonía

3-Maratón

4-Taller de la Memoria

5-Encuentros participativos:

6-Trabajos de investigación en conjunto con el Instituto Nacional de Ciencias para la Salud- INICSA

## **Criterios de Inclusión y exclusión**

Ingresarán en el programa todas las personas que voluntariamente deseen participar. Se excluirán a quienes presenten signos de descompensación

cardiometabólica. Riesgo extremo de realizar las prácticas indicadas o cuando la persona por su decisión decida no participar.

### **Logros del programa**

En dos años de trabajo se logró conformar un grupo de trabajo conformado por diferentes instituciones INICSA, Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología y la Fundación Grupo de Amigos de los Diabéticos. Y personas de diferentes ámbitos, académico, asistencial y comunitario.

Se traslado información y se formó en aspectos básicos de cuidados de la salud a un grupo de 80 personas.

Se desarrolló un programa de actividad física basado en el Taekwon-do "Programa Armonía" con la participación activa de un grupo estable de 50 personas.

Se organizó un evento anual Maratón para Personas con y sin Diabetes con la participación de 700 personas.

Se trabajó en la detección de problemas sanitarios como el cáncer, hipotiroidismo y encefalopatía diabética, lográndose una publicación en la revista Nutrition y participación en Congresos Internacionales y Nacionales.