

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –  
BIOQUÍMICA

**Efeitos Neuromodulatórios e Neurotróficos da Insulina Sobre o  
Envelhecimento Cerebral**

Clarissa Branco Haas

Orientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –  
BIOQUÍMICA

**Efeitos Neuromodulatórios e Neurotróficos da Insulina Sobre o  
Envelhecimento Cerebral**

Clarissa Branco Haas

Orientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2013

## Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Nara e João, pelo apoio em todas as etapas de minha vida nessa caminhada até o término do mestrado, sem eles, certamente, nada disso seria possível.

Quero agradecer, em especial, à minha avó Wilma pela dedicação e preocupação com todos os seus netos, alguém que sempre passou exemplo de força e coragem.

Gostaria de agradecer ao professor Roska, pela oportunidade e por acreditar no meu trabalho.

Agradeço muito ao Alexandre por todas as lições com ele aprendidas sobre neurociências e bioquímica e também por orientar o presente trabalho e pela força que meu deu nesses dois anos, mesmo quando precisei mudar o rumo das minhas pesquisas.

Agradeço muito também ao professor Diogo Souza que também acredita no meu trabalho e sempre tem uma palavra amiga e um sorriso para nos alegrar.

Agradeço a minha Irmã, Renata, por acreditar no meu potencial e me dar força.

Gostaria de agradecer, também aos meus outros familiares, Suzana, Virgínia e Luíz por acreditarem na minha capacidade, que muitas vezes nem eu acredito.

Agradeço aos amigos e colegas do laboratório, Andressa, Bina, Fezinha, Jana, Eduardo, Russo, Ju, Denis, Rico, Marcos, Marcelo, Júlia, Gisele, Debs, André, Edy, Lu, Gabi, Dani, Adriano, Denise, Roberto, Marcelo Costa, Jean, Talita, Vítor, Natan pela amizade e também pela ajuda para que esse trabalho se realizasse.

Agradeço aos demais amigos, Ju, Douglas, Carol, Bruna, Vicky, Paty, Desi, Tati, Ludy, Jaque, pela força durante toda a trajetória e por me desculparem por todas as vezes que recusei um convite, pois precisava “fazer experimento”.

Agradeço ao pessoal do departamento que incansavelmente nos ajudam o pessoal da portaria, Rodrigo, Marcelo, Edi, o pessoal do ratário, e da secretaria, Cléia, Claudia e Douglas.

Agradeço minha relatora e amiga a prof. Christianne Gazzana Salbego, e à banca avaliadora pela disposição em avaliar esse trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao meu namorado, amigo e parceiro, Thiago Ramos, por torcer por mim sempre, ter uma palavra amiga e acreditar e me dar força pra seguir a carreira acadêmica.

Por fim, agradeço a todas essas pessoas por fazerem parte da minha vida. Cada um com seu papel, mas todos de alguma forma acreditando na conclusão desse mestrado. Cada vez mais vejo que sem os outros em nossas vidas não somos nada e é preciso valorizá-los quando eles estão perto. Por isso o meu “MUITO OBRIGADA”!

## Índice

<b>PARTE I</b>	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 ENVELHECIMENTO	6
1.2 INSULINA	7
1.2.a. SINALIZAÇÃO CEREBRAL DA INSULINA	8
1.2.b. ORIGEM DA INSULINA NO SNC	9
1.2.c. CASCATA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO SNC	9
1.2.d. INSULINA E ENVELHECIMENTO	10
1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO DO SNC	10
1.3.a. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO	11
1.3.b. INSULINA E NEUROENERGÉTICA	12
1.4 FUNÇÃO MITOCONDRIAL DO SNC	12
1.4.a. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO	13
1.4.b. SINALIZAÇÃO DA INSULINA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL	14
1.5 NEUROGÊNESE	15
1.5.a. MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – BrdU	16
1.5.b. NEUROGÊNESE NO ENVELHECIMENTO	16
1.5.c. NEUROGÊNESE E A SINALIZAÇÃO DA INSULINA	17
1.6 HIPOCAMPO	18

2. OBJETIVOS	19
2.2 OBJETIVO GERAL	19
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
PARTE II	20
CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO	21
PARTE III	53
1. DISCUSSÃO	54
2. PERSPECTIVAS	62
REFERÊNCIAS	63

## **PARTE I**

## RESUMO

O envelhecimento é um fator de risco para o desenvolvimento de alterações estruturais e funcionais associadas a doenças neurodegenerativas. A perda de neurônios em conjunto com alterações das conexões neurais, principalmente no hipocampo, tem sido associada ao declínio cognitivo no envelhecimento, e várias alterações neuroquímicas moduladas pela ação de hormônios neuroendócrinos parecem participar desse processo. Realmente, prejuízos na sinalização cerebral de insulina têm sido envolvidos na etiologia dos prejuízos cognitivos e de doenças neurodegenerativas. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da administração intracerebroventricular (ICV) de insulina na memória espacial, plasticidade mitocondrial e de células neurais. Ratos Wistar machos (jovens: 4 meses e velhos: 24-26 meses; n=10-12) foram tratados com insulina ICV (20mU) ou veículo uma vez ao dia durante 5 dias. A insulina aumentou os níveis extracelulares de lactato no hipocampo de animais jovens, mas não nos animais velhos. A produção de  $H_2O_2$  mitocondrial, estimulada por succinato, diminuiu no grupo velho-insulina, em relação aos outros grupos. Além disso, o imunocontéudo da proteína estimuladora de biogênese, PGC1- $\alpha$ , aumentou em animais jovens tratados com insulina. A insulina também melhorou o desempenho dos animais jovens na tarefa do Labirinto Aquático de Morris e aumentou os níveis hipocampais de BDNF nesses animais. A insulina modulou de maneira distinta a morfologia das sub-regiões CA1, CA3 e GD em animais jovens e velhos, mas aumentou a neurogênese em CA1 e CA3 somente nos animais velhos. Em resumo, o envelhecimento diminuiu a sensibilidade hipocampal à insulina no que se refere ao metabolismo do lactato, biogênese, BDNF e neuroplasticidade (número de células neurais e neurogênese). Entretanto, a administração de insulina ICV foi efetiva em aumentar a neuroplasticidade hipocampal no envelhecimento.

## ABSTRACT

Aging is a risk factor for the development of brain structural and functional alterations associated with neurodegenerative disorders. The loss of neuronal cells along with the disruption of neural systems, mostly in the hippocampus, has been implicated in the cognitive decline associated with aging. A multitude of neurochemical changes modulated by neuroendocrine hormones may participate in this process. Indeed, impaired brain insulin/insulin receptor (IR) signaling that occurs through central insulin resistance is involved in the etiology of cognitive dysfunction and neurodegenerative disorders. The main goal of this study was to assess the effects of intracerebroventricular (ICV) insulin on spatial memory and mitochondrial and neural plasticity in aged rats. Male Wistar rats (young: 4 months and aged: 24-26 months; n= 10-12) were given ICV injections of insulin (20 mU) or vehicle daily over the course of five days. Insulin significantly increased extracellular fluid lactate levels in the hippocampus of young but not in aged rats. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production induced by succinate was decreased in aged-insulin group relative to other groups. In addition, the immunoccontent of mitochondrial PGC1- $\alpha$ , a biogenesis-stimulate protein, was increased by insulin administration in young animals. Insulin ICV improved spatial memory in the Water Maze task and hippocampal BDNF levels only in young animals. Insulin differentially modulated the hippocampal CA1, CA3 and DG morphology of young and aged rats but increased neurogenesis in CA1 and CA3 regions of aged animals. In summary, aging decreased hippocampal insulin sensitivity regarding lactate metabolism, mitochondrial biogenesis, BDNF expression and neuroplasticity (cell counts and neurogenesis). However, ICV insulin administration was effective in improving neuroplasticity in the hippocampus of aged rats.



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

Akt: Proteína Cinase B (PKB), do inglês “V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene”

ANLS: Transporte de Lactato Astrócito – Neurônio, do inglês “Astrocyte – Neuron Lactate Shuttle”

ATP: Trifosfato de Adenosina

Bcl-2: Linfoma de Células B tipo 2, do inglês “B-Cell Lymphoma 2”

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo, do inglês “Brain-Derived Neurotrophic Factor”

BHE: Barreira Hemato – Encefálica

BrdU: 5-Bromodeoxiuridina

DA: Doença de Alzheimer

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês, “Reactive Oxygen Species”

FGF-2: Fator de Crescimento de Fibroblastos 2, do inglês “Fibroblast Growth Factor 2”

FOXO: do inglês “Forkhead Box”

GABA: Ácido Gama - Aminobutírico

GD: Giro Denteado

GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida, do inglês “Glial Fibrillary Acidic Protein”

Glut-3: Transportador de Glicose tipo 3

GSK3- $\beta$ : Glicogênio cinase 3, do inglês “Glycogen Synthase Kinase 3”

GTT: Teste de tolerância à glicose, do inglês “Glucose Tolerance Test”

ICV: Intracerebroventricular

IGF-I: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo I, do inglês “Insulin Growth Factor-I”

IRS-2: Substrato do Receptor de Insulina tipo 2, do inglês “Insulin Receptor Substrate 2”

LRP-2: do inglês “Receptor – Related Protein 2”

MAPK: Proteína Cinase Ativada por Mitógeno, do inglês “Mitogen – Activated Protein Kinase”

MCT-2: Transportador de Ácidos Monocarboxílicos tipo 2, do inglês “Monocarboxylate Transporter 2”

MP: Membrana Plasmática

mTOR: Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos, do inglês “Mammalian Target of Rapamycin”

NeuN: Antígeno Neuronal Nuclear, do inglês “Neuronal Nuclear Antigen”

PET: Tomografia de Emissão de Pósitrons, do inglês “Positrons Emission Tomography”

PGC1- $\alpha$ : do inglês “Peroxisome Proliferator - Activated Receptor Gamma Coactivator 1-  $\alpha$ ”

PI3K: Fosfatidilinositol 3 Cinase, do inglês “Phosphatidylinositol 3 – Kinase”

RAS: do inglês “Rat Sarcoma Virus”

RI: Receptor de Insulina

RNA: Ácido Ribonucleico

SNC: Sistema Nervoso Central

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, do inglês “Thiobarbituric Acid Reactive Substances”

TrkB: do inglês “Tyrosine – Related Kinase B”

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular, do inglês “Vascular Endothelial Growth Factor”

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ENVELHECIMENTO

Com o aumento da expectativa de vida da população, o envelhecimento cerebral e a sua estreita associação com doenças neurodegenerativas como, por exemplo, as doenças de Alzheimer e Parkinson, têm sido alvo de intensas investigações nos últimos anos. Enquanto em 1990 a expectativa de vida alcançava somente 67,7 anos de idade, em países desenvolvidos, hoje as pessoas vivem em média até os 77 anos de idade (Driscoll et al., 2008). Apesar do imenso progresso científico neste campo, durante a última década, os mecanismos celulares e moleculares cerebrais responsáveis pelos prejuízos cognitivos associados ao envelhecimento, ainda não foram totalmente estabelecidos. Além disso, a demência associada ao envelhecimento diminuiu consideravelmente a qualidade de vida dessas pessoas.

Algumas alterações normais relacionadas ao envelhecimento foram caracterizadas, como, por exemplo, declínio na memória, alterações na visão, perda de audição progressiva, diminuição da coordenação motora e da força muscular. Diferentemente das alterações normais, doenças neurodegenerativas são caracterizadas por uma progressiva e lenta perda neuronal específica, levando a déficits neurológicos substanciais (Ziv and Melamed, 2010). A perda neuronal progressiva no córtex frontal e hipocampo, durante o envelhecimento, têm sido fortemente associada a prejuízos cognitivos (Whitwell and Jack, 2005). Além das alterações morfológicas, alterações neuroquímicas também estão presentes ao longo do processo de envelhecimento, incluindo prejuízos no metabolismo da glicose (Hoyer, 2004), alterações na função mitocondrial (Yin et al., 2012), aumento na geração de EROS e a diminuição da sinalização neuroendócrina (Dickstein et al., 2012).

Existem duas teorias principais sobre o envelhecimento cerebral. A primeira defende que existem alterações geneticamente programadas de aparecimento tardio, como o encurtamento progressivo dos telômeros nas divisões celulares. E a segunda inclui alterações celulares resultantes de danos ou erros que se acumulam ao longo do tempo. É provável que a susceptibilidade aumentada ao estresse metabólico possa ser devido a uma combinação de fatores relativos às duas teorias. O acúmulo de EROS e mutações do DNA nuclear e mitocondrial causados por danos induzidos por radiação, por exemplo, podem ser incluídos na enorme gama de fatores relacionados aos processos de senescência celular (Shetty et al., 2011).

Assim sendo, o envelhecimento é o maior fator de risco para o desenvolvimento de alterações funcionais e estruturais do cérebro associadas às doenças neurodegenerativas (Hofer et al., 2003). Assim, alguns resultados recentes de estudos epidemiológicos sugerem que a obesidade e a diabetes são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Ott et al., 1999), incluindo a DA (McNay et al., 2010).

## 1.2 INSULINA

Em 1923, Banting e colaboradores receberam o prêmio Nobel pela “descoberta da insulina”. Na verdade eles foram os primeiros a extrair a insulina do pâncreas e utilizá-la para tratar cachorros diabéticos. Ao longo do tempo, inúmeros pesquisadores dedicaram suas pesquisas a este hormônio e, hoje, sabemos que a sinalização de insulina é um processo vital que está presente desde bactérias até na espécie humana (Ghasemi et al., 2013). A insulina é o hormônio anabólico mais importante identificado até hoje. O seu efeito bioquímico primário é manter os níveis sanguíneos fisiológicos de glicose e ainda estimular a lipogênese, a síntese proteica e a proliferação celular. Praticamente

todos os tecidos são sensíveis à sinalização de insulina, entretanto alguns tecidos apresentam maior sensibilidade como músculos, fígado e tecido adiposo. Como outros hormônios, a insulina se liga especificamente em seu receptor, entretanto é considerado um hormônio pleiotrópico pela sua múltipla atividade sobre diversas cascatas de sinalização. Além disso, a sinalização desse hormônio regula processos metabólicos como transporte de glicose, glicogênese, síntese de lipídeos e ainda é capaz de modificar a expressão de genes específicos (Fulop et al., 2003).

### 1.2.a. SINALIZAÇÃO CEREBRAL DA INSULINA

A sensibilidade do tecido nervoso à sinalização de insulina foi descoberta no início da década de 60 (Chowers et al., 1966). Nos primeiros anos, os pesquisadores concentraram esforços na investigação da origem da insulina no SNC e na localização dos seus receptores. Atualmente, a maioria dos trabalhos trata dos efeitos funcionais da insulina no cérebro, o que tem se mostrado um vasto campo de pesquisa (Ghasemi et al., 2013). A presença de RIs já foi detectada em todas as regiões do cérebro, mas principalmente em áreas relacionadas com aprendizado e memória como hipocampo, córtex cerebral e amígdala (van der Heide et al., 2006). A sinalização cerebral da insulina modula funções que incluem regulação do metabolismo, modulação de sistemas de neurotransmissão gabaérgico e glutamatérgico e efeitos tróficos sobre diversos tipos celulares presentes no cérebro, principalmente sobre neurônios e astrócitos (Schioth et al., 2012). Esses efeitos neuromodulatórios e neurotróficos são importantes para os processos de aprendizado e memória e para o desenvolvimento e sobrevivência de células neurais (Park, 2001, Craft and Watson, 2004).

As funções da insulina no cérebro tem sido foco de estudo do nosso grupo de pesquisa e, dessa forma, demonstramos que o exercício físico é capaz de aumentar a

sinalização hipocampal de insulina, facilitando o aprendizado e a memória e ainda, que a insulina diminui o estresse oxidativo cerebral, em um modelo de resistência cerebral à insulina induzido pela administração ICV de estreptozotocina em camundongos (Muller et al., 2011, Muller et al., 2012c).

#### 1.2.b. ORIGEM DA INSULINA NO SNC

A origem da insulina no SNC é considerada uma questão controversa pela literatura que trata desse tema. A hipótese mais aceita, atualmente, é que a insulina atravessa a BHE mediada por um sistema de transporte específico denominado LRP-2. Esse sistema é saturável a baixos níveis e está acoplado aos RIs presentes nos vasos cerebrais (Ghasemi et al., 2013). Em 1997, Banks e colaboradores demonstraram que os níveis sanguíneos de insulina que saturam o LRP-2, são menores e independentes daqueles necessários para regular a homeostase da glicose sanguínea (Banks et al., 1997). Entretanto, também foi demonstrado que a insulina pode ser produzida pelos neurônios, uma vez que já foi encontrada pró-insulina no SNC (Ghasemi et al., 2013).

#### 1.2.c. CASCATA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO SNC

A sinalização da insulina no SNC, na maioria das vezes, é mediada por duas cascatas de sinalização em paralelo: PI3K – Akt e RAS – MAPK. A cascata da PI3K – Akt promove a ativação e inibição de proteínas como mTOR, GSK3- $\beta$  e FOXO estando relacionada com processos chaves para o SNC como: transcrição proteica, apoptose, autofagia e estresse oxidativo. O controle fino das proteínas da cascata PI3K – Akt promove a sobrevivência neuronal, enquanto que a sinalização da RAS – MAPK promove a morte celular (van der Heide et al., 2006, Fernandez and Torres-Aleman, 2012).

#### 1.2.d. INSULINA E ENVELHECIMENTO

Mudanças na resposta dos RIs durante o processo de envelhecimento cerebral podem surgir devido aos níveis aumentados de colesterol e diminuição da fluidez da membrana plasmática (prejudicando os movimentos laterais dos lipídeos de membrana), ou ainda, por modificações na internalização, reexpressão ou degradação pelo proteossoma, desse receptor. A essas alterações também tem sido associadas à diminuição do número de RIs cerebrais e sua capacidade de ligação nas regiões hipocampo, córtex e plexo coróide (Duarte et al., 2012). A diminuição da quantidade dos RIs está relacionada com déficits no aprendizado e memória encontrados durante o envelhecimento.

Resultados anteriores, do nosso grupo de pesquisa, mostraram que o cérebro envelhecido apresenta mecanismos adaptativos, embora não efetivos que envolvem aumento dos receptores, mas diminuição da sinalização pelo IGF-I, hormônio com efeitos semelhantes à insulina (Muller et al., 2012a).

#### 1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO DO SNC

O metabolismo energético cerebral é um processo altamente compartimentalizado e complexo, onde o transporte dos metabólitos, entre os diversos tipos celulares, exerce um papel chave (Wyss et al., 2011). Por muitos anos, a glicose sanguínea foi considerada o único substrato energético para o cérebro adulto saudável. Entretanto, alguns estudos, ao reportarem a presença de diferentes substratos energéticos, em diferentes situações como neurodesenvolvimento cerebral e doenças cerebrais, iniciaram a quebra desse paradigma (Wyss et al., 2011). Há 16 anos, foi proposta a teoria do transporte do lactato entre neurônio e astrócito, e seu uso como substrato energético para o cérebro. Ao longo desses anos, diversos trabalhos têm

demonstrado as implicações dessa teoria na neuroenergética. Atualmente, ela se mostra uma ferramenta experimental útil, para melhor compreender a ligação entre atividade energética neuronal – glial, neuroplasticidade e processos de neurodegeneração causados por prejuízo neuroenergéticos (Pellerin, 2008, Pellerin and Magistretti, 2012).

### 1.3.a. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO

Análises de cérebros envelhecidos têm demonstrado redução no seu metabolismo energético. Por exemplo, imagens, utilizando PET, de cérebros humanos normais e com idade avançada indicaram diminuição na utilização de glicose com o avanço da idade (Petit-Taboue et al., 1998). Essas alterações têm sido atribuídas à diminuição do suprimento energético cerebral em consequência de alterações neurovasculares. Esses prejuízos causam alterações bioenergéticas e a morte neuronal (Shetty et al., 2011). Assim, é possível que a diminuição da capacidade neuroenergética durante o envelhecimento, influenciado pela diminuição da sinalização hormonal possa estar envolvida na perda de viabilidade e função das células neurais e no prejuízo das funções cognitivas. Além disso, durante tarefas cognitivas que se refletem em maior atividade cerebral existe uma demanda maior por glicose, e a disponibilidade desse substrato no cérebro envelhecido parece estar diminuída (Gold, 2005, Foster et al., 2008).

### 1.3.b. INSULINA E NEUROENERGÉTICA

A insulina regula a homeostase da glicose nos tecidos periféricos, e age sobre o hipotálamo, regulando o centro da fome e o metabolismo cerebral (McNay et al., 2010). Bingham e colaboradores demonstraram que níveis de insulina no jejum estimulam ao máximo o metabolismo da glicose no córtex cerebral de humanos (Bingham et al., 2002). Além disso, estudos recentes têm sugerido que o hipocampo, região cerebral altamente



responsiva à insulina, apresenta translocação de GluT-3 para a MP dos neurônios na presença desse hormônio. Estes dados sugerem que a insulina aumenta a captação e metabolização da glicose hipocampal (McEwen and Reagan, 2004, Reagan, 2005).

A administração cerebral de insulina mostrou-se capaz de aumentar a utilização de glicose e os níveis extracelulares de lactato em ratos adultos (McNay et al., 2010), sendo o lactato um substrato energético alternativo ao cérebro, principalmente em condições de alta demanda energética (Moreira et al., 2009). Entretanto pouco se sabe sobre os efeitos da insulina sobre a neuroenergética no envelhecimento.

#### 1.4 FUNÇÃO MITOCONDRIAL DO SNC

O oxigênio ( $O_2$ ) é essencial para o funcionamento dos organismos eucarióticos. Seu papel na sobrevivência está ligado ao seu elevado potencial redox, que, dessa forma, torna o  $O_2$  um excelente agente oxidante capaz de aceitar facilmente elétrons a partir de substratos reduzidos. Os tecidos apresentam diferentes demandas de  $O_2$ . Essa demanda vai depender da atividade funcional e das funções metabólicas que esses tecidos realizam no organismo. Os neurônios e astrócitos são os principais responsáveis pelo extenso consumo de  $O_2$  cerebral, que é de aproximadamente 20% do  $O_2$  total consumido pelo organismo (Gandhi and Abramov, 2012).

A mitocôndria tem funções importantes no SNC, como a geração de ATP, biossíntese de metabólitos e neurotransmissores, homeostase do cálcio, controle da morte celular e produção de EROS (Waldbaum and Patel, 2010). Espécies parcialmente reduzidas de oxigênio são altamente reativas, devido ao fato de serem altamente instáveis e por isso precisam aceitar e doar elétrons. Existem diversas formas de EROS, incluindo tanto radicais de oxigênio, quanto moléculas não radicais que são facilmente convertidas em radicais livres (Halliwell, 2006). Quando há uma situação de

desequilíbrio entre a produção mitocondrial de EROS e os níveis de antioxidantes na célula, ocorrem danos celulares causados pelo excesso de EROS que foi denominado como estresse oxidativo (Gandhi and Abramov, 2012).

Os neurônios apresentam uma grande quantidade de mitocôndrias, tornando o cérebro altamente vulnerável aos danos induzidos pelo estresse oxidativo. Além disso, o cérebro também apresenta outras condições que contribuem para essa vulnerabilidade, como grau elevado de lipídios e metais oxidáveis, alto consumo mitocondrial de oxigênio, e baixa capacidade antioxidante. Devido, principalmente à baixa capacidade antioxidante, a morte neuronal precoce está presente em várias doenças neurodegenerativas (Waldbaum and Patel, 2010).

Uma proteína que está envolvida na regulação da função e plasticidade mitocondrial em condições de alta demanda metabólica e estresse celular é a PGC1- $\alpha$ . Essa proteína também é responsável por promover o processo de biogênese mitocondrial (Chen et al., 2011).

#### 1.4.a. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO

Alguns paradigmas sobre o envelhecimento cerebral são relacionados à atividade mitocondrial. Muitos estudos já encontraram alterações mitocondriais no SNC na idade avançada. Essas alterações envolvem ganho e perda de função mitocondrial que se refletem na diminuição do transporte de elétrons, pela cadeia respiratória, e aumento da produção de EROS na mitocôndria (Navarro and Boveris, 2007, Stoll et al., 2011, Currais and Maher, 2012). Ainda não se sabe ao certo se a origem dessas alterações funcionais está representada por efeitos fora ou dentro da mitocôndria. Alguns trabalhos reportam que a mutação do DNA mitocondrial pode acelerar a progressão do envelhecimento (Swerdlow, 2011).

Por outro lado, tanto estudos com humanos quanto em modelos animais demonstram que a diminuição da atividade mitocondrial, assim como, o aumento na produção de EROS, participa dos mecanismos envolvidos na etiologia de doenças neurodegenerativas (Kilbride et al., 2008). Além disso, uma série de evidências aponta para a disfunção mitocondrial como um evento de início precoce e de longa duração que contribui para disfunções sinápticas no envelhecimento e para o aumento da suscetibilidade de idosos às doenças neurodegenerativas (Schmitt et al., 2012).

#### 1.4.b. SINALIZAÇÃO DA INSULINA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL.

Algumas evidências demonstram que a insulina apresenta ação neuroprotetora contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo no SNC. Em 2003, Duarte e colaboradores mostraram que, sobre condições de estresse oxidativo, a insulina é capaz de reverter a diminuição da captação de glutamato e GABA (Duarte et al., 2003). Esses autores também demonstraram que os mecanismos de neuroproteção da insulina não envolvem diminuição da peroxidação lipídica avaliado por TBARS (Duarte et al., 2004). Ainda, a estimulação da captação e metabolismo de glicose, no SNC, estaria relacionada com os mecanismos neuroprotetores da insulina contra o estresse oxidativo (Duarte et al., 2006). Aparentemente, a insulina poderia causar aumento da atividade de proteínas, como a hexoquinase-II e família de proteínas Bcl-2 (anti-apoptóticas) e diminuição da caspase-3, aumentando o metabolismo da glicose e melhorando as defesas antioxidantes neuronais (Duarte et al., 2012).

Embora, já existam evidências de que a insulina no SNC apresenta efeitos benéficos contra o estresse oxidativo, ainda não há nenhum trabalho relacionando esses efeitos com o aumento de EROS encontrado no envelhecimento. Além disso, os efeitos

da sinalização cerebral de insulina sobre a proteína PGC-1 $\alpha$ , também, não foram explorados até o presente momento.

## 1.5 NEUROGÊNESE

A descoberta revolucionária da neurogênese pós-natal, quebrou um dogma presente até então na neurociência, de que os neurônios presentes no cérebro adulto dos mamíferos seriam células sem capacidade proliferativa. Anos depois, duas regiões “neurogênicas” foram descobertas em roedores adultos e primatas, nas áreas subventricular lateral dos ventrículos cerebrais e subgranular do giro dentado no hipocampo (Song et al., 2012).

Atualmente, já está bem definido que o hipocampo é uma região cerebral onde existe neurogênese também na fase adulta. Nessa região, a neurogênese resulta na formação de novas células principalmente no giro dentado em que as células granulares estendem seus dendritos e axônios para formar novas conexões. As novas células se integram com as demais células e apresentam sensibilidade a estímulos internos e externos como as outras células pré-existentes (Amrein et al., 2011). Existem diferenças eletrofisiológicas e morfológicas dos neurônios gerados na juventude e na idade adulta. Os neurônios gerados tardiamente podem ser transitórios e morrer pouco tempo depois, ou apresentarem elementos funcionais distintos. Dessa forma, muitas vezes essas células são geradas, cumprem seu papel e depois morrem (Mongiat and Schinder, 2011).

### 1.5.a. MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – BrdU

Os estudos sobre a neurogênese na fase adulta progrediram quando foram desenvolvidos os análogos de timidina que substituíram a primeira técnica usada para marcar células mitóticas ativas. Essa técnica utilizava um marcador radioativo, timidina marcada com trítio. A detecção desse marcador era feita utilizando autorradiografia ou técnicas de cintilação (Cavanagh et al., 2011). O análogo de timidina mais utilizado, atualmente, é o 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) que é rapidamente incorporado ao DNA das células em divisão durante a fase S do ciclo celular, no momento em que ocorre a duplicação do DNA (Landgren and Curtis, 2011). O desenvolvimento de um anticorpo específico para o BrdU permitiu a detecção do DNA recém sintetizado que foi capaz de incorporar o análogo da timidina, ao invés de timidina. A detecção desse marcador é feita principalmente por imunohistoquímica (Cavanagh et al., 2011).

### 1.5.b. NEUROGÊNESE NO ENVELHECIMENTO

A neurogênese é um processo chave que colabora para a plasticidade sináptica no cérebro adulto. Animais velhos têm menos células progenitoras, menos diferenciação neuronal, e seus “novos neurônios” vivem menos do que nos animais jovens. O declínio na neurogênese, relacionado ao envelhecimento, já está bem documentado, entretanto a causa desse fenômeno é pouco entendida e precisa ser mais investigada (Lee et al., 2012).

Uma possível explicação para esse fenômeno seria em relação ao microambiente em que as células progenitoras se encontram. A neurogênese é altamente regulada pelo nicho celular, que pode ser modificado durante o envelhecimento. Ahlenius e colaboradores mostraram que as células progenitoras retiradas de animais velhos, são capazes de gerar novos neurônios funcionais *in vitro* (Ahlenius et al., 2009). Esses

resultados indicam que existe uma diferenciação das células progenitoras em neurônios, mas que o microambiente celular, no cérebro em envelhecimento, não oferece as condições ideais para a sobrevivência desse neurônio.

Nos nichos favoráveis para neurogênese podem ser encontrados fatores de crescimento, como FGF-2, IGF-I e VEGF, que são promotores da neurogênese, e que estão diminuídos nessa fase. Além disso, processos inflamatórios e estresse oxidativo são dois potentes inibidores da neurogênese, e ambos também estão aumentados no hipocampo dos animais velhos (Lee et al., 2012). Dessa forma, o aumento da resistência cerebral à sinalização de insulina, relatada existente no cérebro envelhecido, pode ser um fator que contribui para a diminuição dos processos de neurogênese no envelhecimento.

#### 1.5.c. NEUROGÊNESE E A SINALIZAÇÃO DA INSULINA

A insulina é um hormônio, e também um fator de crescimento. Seu efeito sobre a proliferação celular, especialmente sobre os neurônios, já foi demonstrado desde 1980 (Roger and Fellows, 1980). Em 2003, Schubert e colaboradores demonstraram que a neurogênese durante o desenvolvimento é severamente prejudicada em camundongos sem a expressão da proteína IRS-2, que está acoplada ao RI, mostrando que a sinalização desse receptor tem um papel indispensável nesse processo (Schubert et al., 2003).

Por outro lado, os efeitos da insulina no aumento da plasticidade neuronal e sináptica parecem estar ligados a um efeito conjunto com a sinalização de outro fator neurotrófico bastante conhecido, o BDNF. O efeito conjunto desses dois fatores também afeta a regulação do metabolismo e processos de aprendizado e memória (de la Monte and Wands, 2005). O receptor de BDNF, TrkB, ao ser ativado se autofosforila e recruta

o IRS-2, ativando de forma conjunta a cascata de sinalização de insulina (Mattson et al., 2004).

## 1.6 HIPOCAMPO

A região cerebral alvo do presente estudo foi o hipocampo. Isso porque o hipocampo possui alta densidade de receptores de insulina, exerce um papel chave sobre processos de aprendizado e memória, além de ser uma região primariamente afetada em condições que cursam com o aumento da resistência cerebral à insulina (Moosavi et al., 2006). As sinapses no hipocampo ocorrem primeiramente nas células granulares do GD e seguem através das fibras para as células piramidais da sub-região CA3 e finalmente para a sub-região CA1, que está interligada ao córtex. Sub-regiões do hipocampo possuem diferentes funções nos processos de aprendizado e memória (George Paxinos, 2004).

Neste contexto, o prejuízo na sinalização de insulina pode causar a morte de neurônios do hipocampo, o que parece estar implicado nas alterações morfológicas e na perda das funções cognitivas associadas a essa região cerebral. Por outro lado, evidências sugerem que apesar das semelhanças funcionais entre as três principais sub-regiões do hipocampo (CA1, CA3 e GD), elas diferem significativamente em aspectos relacionados à suas populações celulares, fisiologia e principalmente com relação à sua vulnerabilidade à morte celular (Jackson and Foster, 2009).

## 2. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos neuromodulatórios e neurotróficos da administração ICV de insulina sobre o hipocampo de ratos Wistar jovens e velhos.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram a avaliação dos efeitos da administração ICV de insulina, em hipocampo de ratos Wistar jovens e velhos, sobre:

- Memória espacial;
- Níveis de BDNF;
- Parâmetros mitocondriais, principalmente de stress oxidativo, avaliando a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- Plasticidade mitocondrial, avaliando o imunoconteúdo de PGC1- $\alpha$ ;
- Metabolismo energético cerebral, especificamente níveis de lactato no líquido extracelular;
- Homeostase da glicose periférica;
- Neurogênese;
- Plasticidade neuronal e astrocitária.



## **PARTE II**

## Capítulo I

Artigo Científico Submetido à revista Hippocampus

**“Brain insulin resistance and cognitive function in aging rats: neuromodulatory  
and neurotrophic effects of insulin administration**

**Running title: Insulin effects on aging brain”**



**Brain insulin resistance and cognitive function in aging rats:  
neuromodulatory and neurotrophic effects of insulin  
administration**

Journal:	Hippocampus
Manuscript ID:	HIPO-12-281
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Keywords:	Aging, brain mitochondrial metabolism, insulin resistance, learning and memory, neurogenesis

SCHOLARONE<sup>®</sup>  
Manuscripts

Review

**Brain insulin resistance and cognitive function in aging rats: neuromodulatory and neurotrophic effects of insulin administration**

**Running title: Insulin effects on aging brain**

**Clarissa B. Haas<sup>a</sup>, Eduardo Kalinine<sup>a</sup>, Eduardo Rigon Zimmer<sup>a</sup>, Andressa Brochier<sup>a</sup>, Gisele Hansel<sup>a</sup>, Luis V. Portela<sup>a</sup>, Alexandre P. Muller<sup>a\*</sup>**

a. Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica. Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

**\*Corresponding author:**

**Prof. Alexandre Pastoris Muller, PhD**

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

CEP 90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

Email: [alexandrep.muller@gmail.com](mailto:alexandrep.muller@gmail.com)

Telephone: 55 51 33085557

Fax: 55 51 33085544

Number of pages: 25

Figures: 7

Table:1

Grant sponsor: INCT-Excitotoxicity and Neuroprotection CNPq; Grant number: 573577/2008-5. Grant sponsor: CAPES. Brasil-Switzerland Program for Science and Technology –CNPq, Grant sponsor FAPERGS-PPSUS; Grant number: 09/0068-1.

**Key words:** Aging, brain metabolism, insulin resistance, learning and memory, mitochondria, neurogenesis.

## **Abstract**

Aging is a risk for the development of brain structural and functional alterations associated with neurodegenerative disorders. The loss of neuronal cells along with the disruption of neural systems, mostly in the hippocampus, has been implicated in the cognitive decline associated with aging. A multitude of neurochemical changes modulated by neuroendocrine hormones may participate in this process. Indeed, impaired brain insulin/insulin receptor (IR) signaling that occurs through central insulin resistance is involved in the etiology of cognitive dysfunction and neurodegenerative disorders. The main goal of this study was to assess the effects of intracerebroventricular (i.c.v) insulin on spatial memory (MWM) and mitochondrial and neural plasticity in aged rats. Male Wistar rats (young: 4 months and aged: 24-26 months; n= 10-12) were given i.c.v injections of insulin (20 mU) or vehicle daily over the course of five days. Insulin significantly increased extracellular fluid lactate levels in the hippocampus of young but not in aged rats. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production induced by succinate was decreased in aged-insulin group relative to other groups. In addition, insulin i.c.v for 5 days improved the effect of insulin at 10 ng/ml in decreased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in young animals. Also, the immunoccontent of mitochondrial PGC1- $\alpha$ , a biogenesis-stimulate protein, was increased by insulin administration in young animals. Insulin i.c.v improved spatial memory in the MWM and hippocampal BDNF levels only in young animals. Insulin differentially modulated the hippocampal CA1, CA3 and DG morphology of young and aged rats but increased neurogenesis in CA1 and CA3 regions of aged animals. In summary, aging decreased hippocampal insulin sensitivity regarding lactate metabolism, mitochondrial biogenesis, BDNF expression and neuroplasticity (cell counts and neurogenesis). However, i.c.v insulin administration was effective in improving neuroplasticity in the hippocampus of aged rats.

## **Introduction**

Aging is a major risk factor for the development of brain structural and functional alterations associated with neurodegenerative disorders. Glial and neuronal cells in the central nervous system are affected by aging, which results in a continuous and progressive decline in sensory, motor and cognitive function (Hofer et al., 2003). The loss of neuronal cells along with the disruption of neural systems that participate in different aspects of cognitive function, particularly in the frontal cortex and hippocampus, has been implicated in the cognitive decline associated with aging (Whitwell and Jack, 2005).

Although the majority of brain regions are affected, the hippocampus has been shown to have an increased vulnerability to cell death associated with aging. Even the hippocampal neurons from the CA1, CA3 and dentate gyrus present differences in relation to their physiology and vulnerability to cell death (Jackson and Foster, 2009). Moreover, the hippocampus presents a remarkable disruption of the neural network connectivity (Hofer et al., 2003) associated with aging (Whitwell and Jack, 2005).

Furthermore, a multitude of neurochemical changes that follows the course of aging process, including impaired glucose metabolism (Hoyer, 2004), disruption in mitochondria function (Yin et al., 2012), imbalance in the oxidant/antioxidant status, and decreased neuroendocrine signaling, may act as contributory factors in the breakdown of neural circuitry (Dickstein et al., 2012). Indeed, some peripheral hormones can cross the blood-brain barrier and govern many aspects of the learning and memory function, neuronal survival and network arrangements (McNay et al., , McNay, 2007, Dietrich et al., 2008, McNay et al., 2010, Muller et al., 2011); however, these modulatory functions are potentially disturbed by aging (Gispén and Biessels, 2000, Cole and Frautschy, 2007).

Recently, it has been proposed that the impaired brain insulin/insulin receptor (IR) signaling, namely central insulin resistance, is involved in the pathophysiology of neurodegenerative disorders and impaired cognitive function (de la Monte and Wands, 2005, Porte et al., 2005, de la Monte et al., 2009). Insulin/IR mediates brain responses through a variety of signaling proteins, including proteins associated with mitochondrial function (Cheng et al.), lactate and glucose metabolism (McNay et al., , McNay et al., 2010). In addition, it has been proposed that insulin/IGF-1 signaling works in a cooperative manner with brain-neurotrophic factor (BDNF) to achieve the regulation of metabolism, neuroplasticity and learning and memory function (de la Monte and Wands, 2005).

The main goal of this study was assess in aged rats intracerebroventricular insulin responsiveness on spatial memory, mitochondrial and neural plasticity. In normal brain physiology these outcomes share mechanisms controlled by insulin signaling that once disturbed, represents key pathophysiological elements. Aged rats showed impair responsiveness to insulin regarding peripheral/brain metabolism and neurotrophic signaling in hippocampus.

## **Material and methods**

### ***Animals***

Male Wistar rats (n=24) were housed in plastic cages in a temperature-controlled room under a 12 hr light/12 hr dark cycle with free access to food and water. The rats (4-5 per cage) were assigned to one of following groups: young-vehicle (4 months age, n=12), young-insulin (4 months age, n=12), aged-vehicle (24 months age, n=12) and aged-insulin (24-26 months age, n=10). Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Federation of Brazilian Societies for Experimental

Biology and was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

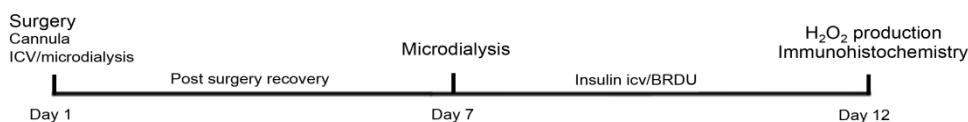
### ***Surgical procedure***

The rats were anesthetized by an intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight). A 27-gauge 9-mm guide cannula was unilaterally placed at 0.9 mm posterior to the bregma, 1.5 mm right of the midline and 1.0 mm above the right lateral brain ventricle. The cannula was implanted 2.6 mm ventral to the superior surface of the skull through a 2-mm hole made in the cranial bone. On the third day post-surgery, the rats displayed normal food intake and water consumption as well as spontaneous locomotion. After surgery animals were engaged in experimental protocols 1 or 2, as follows:

### ***Experimental design 1:***

A

#### Experimental Design 1



To collect extracerebral fluid, a guide cannula (CMA) of microdialysis was placed in dorsal hippocampus at 5 mm posterior to the bregma, 5 mm right of the midline and 2-mm hole made in the cranial bone. Seven days after surgery, animals equipped with the microdialysis cannula were allowed to move freely in their cages throughout measurement. After one hour of habituation to microdialysis artificial extracellular fluid (aECF); (124 mM NaCl, 3 mM KCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O, 1 mM glucose, buffered at pH 7.4) (Garrido et al., 2012), we collected samples in two blocks of 10 min to analyze basal levels. After that, animals received 5 µL of insulin (20 mU) (Lilly, Humulin) or vehicle (1 µL/min) for 5 min via i.c.v, and then aECF samples were collected during 30 min (blocks of 10 min).



Beginning the next day and continuing once a day for 5 consecutive days, animals received intraperitoneal (i.p) administration of BrdU (25 mg/kg) (Sigma-Aldrich) and 5µL i.c.v administration of insulin (20 mU) or vehicle.

#### ***Lactate levels in microdialysis fluid***

Animals in experiment 1 were used to analyze the hippocampal extracellular lactate levels through a commercially available colorimetric kit (Katal, Brazil).

#### ***ROS production***

Hippocampus from animals of the experiment 1 was rapidly removed and homogenized in ‘Sucrose Medium’ (320 mM sucrose, 1mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol, pH 7.4). As a strategy to improve the capacity of the homogenate in generating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> we used standard respiration buffer (100 mM KCl, 75 mM mannitol, 25 mM sucrose, 5 mM phosphate, 0.05 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) with high K<sup>+</sup> to depolarize the cells. This approach permits the detection of classical mitochondrial respiratory responses to anionic substrates and nucleotides (ADP and ATP) in homogenates and synaptosomes of rat forebrain (Sims and Blass, 1986).

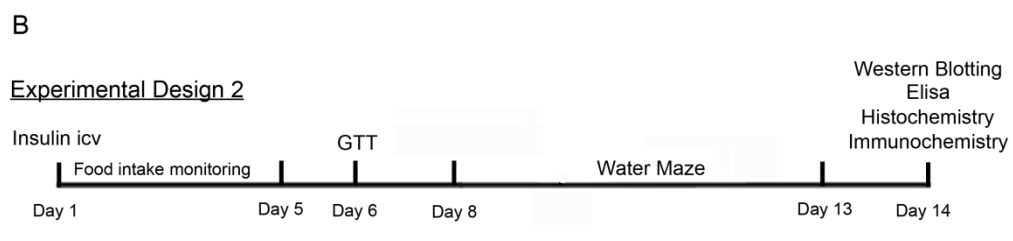
Mitochondrial production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was assessed by the Amplex Red oxidation method (Muller et al., 2012b). The basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level was considered without the presence of substrate in the incubation medium, while succinate was used as substrate to stimulate mitochondrial respiration. Insulin at 10 and 100 ng/ml was incubated in the standard respiration buffer plus succinate to evaluate the effect of insulin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. The hippocampal homogenate (0.1 mg protein/ml) were incubated in the standard respiration buffer supplemented with 10 µM Amplex Red and 2 units/mL horseradish peroxidase. The fluorescence was monitored at excitation (563 nm) and emission wavelengths (587 nm) in Spectra Max M5 microplate reader (Molecular

Devices, USA). Young vehicle animals were considered as control groups and all parameters were analyzed against this group.

### ***BrdU analysis***

The brain sections were incubated in HCl 0,1M (30 min) at 65°C, after that, incubated in Boric acid 0,3M for 15 min at room temperature, washed three times with PBS and then over-night incubation of anti-BRDU 1:200 (Sigma-Aldrich) follow for two hours incubation of 488 nm Alexa-conjugated donkey anti-mouse 1:500 (Milipore). After 24 h, all the sections were mounted with FluorSave Reagent (Calbiochem). The BrdU quantify was performed in 4 slices per animal in the image total area.

### ***Experimental design 2:***



Animals received 5 $\mu$ L of insulin (20 mU) (Lilly, Humulin) or vehicle for 5 min (1  $\mu$ L/min) via i.c.v once a day for 5 consecutive days. Afterward we performed glucose tolerance test (GTT), Morris water maze (MWM) task and animals were killed for further biochemical and neurochemical assessments.

### ***Body weight and Food intake***

Body weight and food intake were concomitantly monitored for five days of insulin or saline icv administration in animals of experiment 2. Each day, food was weighed and added to the cages. The ratio between these days was divided by the number of the animals per cage and was used to estimate food intake.

### **Western blotting**

For western blot analysis, 30  $\mu$ g of protein from the hippocampus homogenates of the animals from the experiment 2 were separated by electrophoresis on a 10%

polyacrylamide gel and electrotransferred to PVDF membranes as previously reported (Muller et al., 2011). Antibodies against PGC1- $\alpha$  (Cell Signaling Technology, 1:1000) and tubulin (Cell Signaling Technology, 1:3000) were used.

#### ***Glucose tolerance test - GTT***

To assess the potential influence of i.c.v insulin administration on peripheral glucose sensitivity, we measured glucose levels (n=8 per group) 1 day after the last i.c.v injection (day 6) in animals of experiment 2. The rats were fasted for 12 h, and blood was then collected via a small puncture in the tail; blood was collected immediately before (0 min) and 30, 60, and 120 min after an i.p. injection of glucose (2 mg/g body weight). Glucose was measured using a glucosimeter (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA).

#### ***Spatial memory - Morris water maze task***

Three days after the last insulin i.c.v administration, the rats from experiment 2 performed the spatial memory task (days 8 to 13). The apparatus is a black circular pool (200 cm in diameter) with a water temperature of  $21 \pm 1$  °C. During training, the rats learned to escape from the water by finding a hidden rigid black platform submerged about 1 cm below the water surface in a fixed location. The rats were trained over 4 trials in a water maze task for five consecutive days, with each trial lasting up to 60 s, and the rats were allowed to rest on a hidden black platform for 20 s. Each trial was separated by a minimum of 12 min. If the rat failed to find the platform in 60 s, it was placed on the platform and allowed to rest for 20 s. The maze was located in a well-lit white room with several visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues. The escape latency during each trial was measured as an indicator of learning. A probe test was performed without the platform twenty-four hours after the five day of acquisition, and the time spent in the target quadrant was measured as an indicator of memory

retention (Muller et al., 2010). Videos were obtained and analyzed using the N-Maze program. Twenty-four hours after the Morris water maze task, the animals were sacrificed by decapitation (day 14) for collecting biological samples.

### ***Hippocampal BDNF levels***

After decapitation, the hippocampus from animals in experiment 2 was dissected and homogenized in PIK buffer (1 % NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, 10% glycerol, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM sodium vanadate, 0.2 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, and 0.1 % phosphatase inhibitor cocktails I and II; Sigma-Aldrich, USA). The homogenate was centrifuged, and the supernatant was collected. The total protein content was measured as described by Peterson (Peterson, 1977). The homogenates were stored at -70 °C until analysis. The BDNF quantification was performed using commercially available ELISA kits (refs. DY248). The protocol was conducted according to the instructions of the manufacturer (R&D systems, USA).

### ***Histochemistry and Immunohistochemistry***

For the histochemical and immunohistochemical studies, the animals from experiment 2 (4-6 rats per group) were sacrificed, and the left hemispheres were post-fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 for 24 h and then placed in a 30% sucrose solution in PBS at 4 °C. Coronal sections (50 µm) were obtained using a Vibratome (Leica, Germany) and stored in PBS 0.2 M buffer. One out of 8 random series were collected for analyses. First, we analyzed the cellular density. Briefly, the sections were hydrated in 95% and 70% ethanol and distilled water, stained with filtered cresyl violet solution (5 mg/mL cresyl violet acetate) for 5 minutes, rinsed in water, and then dehydrated with 70%, 95%, and 100% ethanol. The slides were mounted using Canada balsam. The histochemistry images were acquired on an Olympus microscope (Olympus, Japan). Double immunohistochemical staining was

used to identify neurons and glial cells. The sections were incubated for 48 h at 4 °C with polyclonal rabbit GFAP antiserum (Dako, UK, 1:500) and NeuN (Chemicon, 1:500) in PBS-Tx containing 2% BSA and 0,2% Triton-X100. After several PBS washes, the sections were incubated with 594 nm Alexa-conjugated donkey anti-rabbit and 488 nm Alexa-conjugated donkey anti-mouse antibodies for 2 hr at 4 °C. Next, the slices were stained with DAPI (0.0001%; Milipore) to stain the nuclei. After 24 h, all the sections were mounted with FluorSave Reagent (Calbiochem). To determine the density of fluorescence, 6 slices/animal were photographed using a confocal fluorescence microscopy system (Olympus FV1000,) and analyzed using Image J software. To count number of NeuN, GFAP and DAPI positive cells we used the Image Pro Plus 6.0 software, using the media of five 1mm<sup>2</sup> areas per slice (4 slices/animal).

### *Statistical analysis*

The results were calculated and expressed as the means  $\pm$  S.E.M. The data from the water maze task was analyzed using a repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc Tukey test. To evaluate the effect of insulin between groups, we performed a Student's t-test between groups. For analyzing differences between ages, we used a two-way ANOVA. To analyze the differences between groups, we used one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test. The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Aging impairs increased in lactate levels induced by i.c.v insulin in hippocampus**

Insulin i.c.v administration significantly increased the lactate levels in aECF after 10 and 20 min in young-insulin animals compared to basal levels. However, aging

animals showed no statistical difference in aECF lactate levels after insulin administration (Figure 1 A,  $p < 0.05$ ).

### **Insulin administration affects mitochondrial parameters**

Insulin administration for 5 consecutive days decreased the basal levels of  $H_2O_2$  production in aged rats but not in young animals. The  $H_2O_2$  production induced by succinate was less effective in aged-insulin animals. Insulin administration for 5 days improved the effect of insulin at 10 ng/ml in decrease the  $H_2O_2$  production induced by succinate in young animals. Insulin administration improved the effect of insulin at 100 ng/ml in decreasing the  $H_2O_2$  production induced by succinate in both young and aged animals (Figure 1 B,  $p < 0.05$ ). Insulin administration increased the immunocontent of PGC1- $\alpha$  in hippocampus of young but not in aged animals. Aged-vehicle animals had decreased immunocontent of PGC1- $\alpha$  in hippocampus (Figure 1 C,  $p < 0.05$ ).

### **Food intake, body weight, and glucose metabolism**

Insulin injected i.c.v decreased food intake during the five days of administration in both young-insulin and aged-vehicle rats (Table 1; young-vehicle  $>$  young-insulin; aged-vehicle  $>$  aged insulin  $p < 0.05$ ). Furthermore, insulin decreased food intake 70% in young and 35% in aged rats. Consistent with these results, the body weight also decreased after five days of i.c.v insulin administration (34% in young and 23% in aged rats) (body weight young-vehicle  $>$  young-insulin; aged-vehicle  $>$  aged-insulin  $p < 0.05$ ) (Table 1). Thus, we showed that young rats are more sensitive to i.c.v insulin than aged rats regarding to feeding behavior and body mass control. Next, we analyzed the effect of insulin on peripheral glucose homeostasis 24 h after the five days i.c.v administration. Insulin slightly improved GTT in young rats. The area under the curve decreased in young insulin compared to the other groups (young-insulin  $<$  young-vehicle, aged-vehicle and aged-insulin;  $p < 0.05$ ) (Table 1). Two hours after insulin i.c.v

administration, the serum glucose level was not significantly different between the groups (data not shown).

### **Insulin induced neurogenesis in hippocampus of aged animals**

Insulin i.c.v administration for 5 consecutive days increased the number of BrdU positive cells in CA1 and CA3 subfields of aged animals, but not in young animals (Figure 2 A, B and C,  $p < 0.05$ ).

### **Insulin improved spatial memory performance in young rats and increased hippocampal BDNF levels**

On the third day after insulin i.c.v administration, spatial memory performance was evaluated through the Morris water maze task (MWM) (from days 8 to 13). The hippocampus plays a key role in the formation of memory in this paradigm. From the third to fifth days of the acquisition phase, the young insulin animals showed an improvement in learning (decreased time to find hidden platform) compared to other groups (Figure 3 A; latency of young-insulin < young-vehicle, aged-vehicle and aged-insulin;  $p < 0.05$ ). Aged rats reached a plateau in latency on days 3-5, whereas the young vehicle group trended toward a decrease in latency to find the hidden platform until the last day of the acquisition phase. The memory retention phase was evaluated in a probe trial performed without the platform on day eight after i.c.v insulin injection (day 13). The young-insulin i.c.v animals spent more time in the target quadrant when compared to the other groups (Figure 3 B; young-insulin > other groups;  $p < 0.05$ ). The swim speed was not different between the groups (data not shown).

We also investigated whether insulin i.c.v administration could modulate the level of BDNF in hippocampal tissue, which might positively impact neural plasticity and the performance on spatial memory task. Indeed, nine days after the last injection of insulin (day 14), hippocampal BDNF levels were increased in young animals as

compared to young-vehicle (young-insulin > young-vehicle,  $p < 0.05$ ). The young-vehicle, aged-vehicle and aged-insulin showed no significant differences on hippocampal BDNF levels (Figure 3 C).

### **Insulin administration increases neuronal and glial immunoreactivity in hippocampal subfields**

We analyzed the cellular density, fluorescence density/counts of neurons, glial cells, and nuclei in hippocampal CA1, CA3 and dentate gyrus subfields.

#### *Effect on CA1 subfield*

The representative images obtained with cresyl violet staining (Figure 4 A-D) showed that aging decreased the cellular density in the CA1 (4 C). Insulin administration increased the cellular density in the CA1 in both the young and aged rats (Figure 4 B and D). From this preliminary evaluation, we advanced to using fluorescent markers to identify neural cell-specific responses to neurotrophic effects of insulin.

When examining the neuronal fluorescence density (NeuN), the aged rats showed a decreased fluorescence density compared to the young rats (Figure 5 A young > aged; \* $p < 0.05$ ). Insulin i.c.v administration increased the fluorescence density of NeuN in young-insulin and aged-insulin rats when compared with the vehicle groups (Figure 5 A young-insulin > young-vehicle; aged-insulin > aged; \* $p < 0.05$ ). The astrocyte fluorescence density (GFAP) was not significantly different between the groups or treatment. Furthermore, there was a decreased nuclear fluorescence density (DAPI) in aged rats compared to the young rats (Figure 5 C young > aged; \* $p < 0.05$ ). Insulin increased DAPI fluorescence density in young and aged rats (Figure 5 C young-insulin > young-vehicle; aged-insulin > aged-vehicle; \* $p < 0.05$ ). Overall, the neurons in CA1 showed an increased fluorescence density after insulin i.c.v administration (Figure 5 A - C). Further, aging decreased the number of NeuN positive cells but insulin



administration increased the number of NeuN positive cells in aged animals (Figure 5 D \*aged-vehicle < young-vehicle, young-insulin and aged-insulin;  $p < 0.05$ ). The GFAP and DAPI positive cells were not altered by aging or insulin i.c.v administration. Aging decreased the number of DAPI positive cells (Figure 5 E-F).

#### *Effect on CA3 subfield*

Representative images of cellular density obtained through cresyl violet staining (Figure 4 E-H) demonstrated that aging decreased the cellular density in the CA3 subfield (Figure 4 G), and insulin had no effect (Figure 4 H). Moreover, aging decreased the NeuN fluorescence density compared to young rats, and insulin produced no effect (Figure 6 A; young-vehicle and young-insulin > aged-vehicle and aged-insulin;  $p < 0.05$ ). Neither the GFAP nor DAPI fluorescence density was affected by aging or insulin administration (Figure 6 B-C). Aging decreased the number of NeuN positive cells. Insulin i.c.v administration increased number of NeuN positive cells in aged animals (Figure 6 D \*aged-vehicle < young-vehicle, young-insulin and aged-insulin;  $p < 0.05$ ). The GFAP and DAPI positives cells were not altered by aging or insulin i.c.v administration (Figure 6 E-F).

#### *Effect on dentate gyrus subfield*

Representative images of cellular density through cresyl violet staining (Figure 4 I-L) showed that insulin had no effect in young animals (Figure 4 I-J). Further, aging decreased (Figure 4 K), and insulin increased (Figure 4 L) the cellular density in the dentate gyrus of aged animals. Insulin administration did not affect the fluorescence density of neurons (NeuN) in young-insulin compared to young-vehicle groups. The aged rats showed a decreased NeuN fluorescence density when compared to the young rats (Figure 7 A young > aged; \* $p < 0.05$ ); however, insulin administration raised the NeuN fluorescence of aged rats to a similar level of young rats (aged-insulin = young

groups). Astrocytic and nuclear (GFAP and DAPI, respectively) fluorescence densities were not affected by aging or insulin administration (Figure 7 B-C). Aging decreased the number of NeuN positive cells but insulin administration increased the number of NeuN positive cells in aged animals (Figure 7 D \*aged insulin>aged vehicle;  $p<0.05$ ). Aging decreased the number of GFAP positive cells (Figure 7 E \*young-vehicle and young-insulin> aged-vehicle and aged-insulin;  $p<0.05$ ) The DAPI positive cells was not altered by insulin or aging (Figure 7 F).

## **Discussion**

This study showed that insulin acts as a neurotrophic factor increasing hippocampal BDNF levels in young animals, which positively impacts learning and memory performance in the MWM. However, insulin neither improved memory performance nor increased BDNF in aged rats. Moreover, insulin distinctly modulated brain metabolism in young and aged animals.

Lactate is recognized as a key substrate of brain metabolism in conditions of high energetic demands (Moreira et al., 2009). Insulin administration in the brain has been reported to modulate brain lactate levels in adult rats (McNay et al., , McNay et al., 2010) while the impact of insulin on the brain related to metabolism of the lactate in aged rats has not been demonstrated. Our results showed that i.c.v insulin administration increases hippocampal lactate levels in young animals; however, we showed for the first time that aged animals were not responsive, suggesting a new mechanism of brain insulin resistance affecting metabolism. Moreover, five days of i.c.v insulin administration improved peripheral glucose homeostasis control reflected by increased GTT sensitivity in young animals but not in aged animals. The regulation provided by insulin administration in body mass parameters (decrease fat pads and weight) was also more prominent in younger rats than aged rats.

It has been well-documented that an increase in oxidative damage plays a participatory role in the mechanisms that cause neural cell loss during aging and AD (Uranga et al., 2010). In addition to this, there are some reports suggesting that insulin has potential anti-oxidative properties (Duarte et al., 2004), although these studies were not designed to understand its modulatory role on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Mitochondrial respiration produces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which may exert physiological or pathological effects on the brain (Patten et al., 2010). Aging is a risk factor for increased insulin resistance and neurodegenerative diseases, raising the conjecture that deficient mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> control might be linked to decreased insulin signaling. Here, we observed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by hippocampal mitochondria was not affected by aging in neither basal nor with succinate as substrate to mitochondrial respiration. Further, insulin i.c.v administration for 5 days was able to modulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in hippocampus of aged animals (basal and stimulated). In addition, insulin i.c.v administration improved the regulatory effect of insulin (10 ng/ml) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in hippocampus of young but not in aged animals. The capacity of insulin in modulating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in preparations of brain tissue was already demonstrated by our group using similar doses to the one used here (Muller et al., 2012b). Another important protein involved in the regulation of mitochondrial function/plasticity in conditions of high metabolic demands and cellular stress is the PGC1- $\alpha$ , a promoter of mitochondria biogenesis (Chen et al., 2011). Here we showed that aging decreased the expression of this mitochondrial protein in hippocampus. In addition, hippocampal immunocontent of PGC1- $\alpha$  was responsive to insulin administration in young but not in aged animals, implying a new role of insulin on mitochondrial function that could be disrupted by brain insulin resistance during aging. The molecular mechanisms underlying the modulation of the expression of PGC1- $\alpha$  by insulin needs further investigation.

Insulin receptors are enriched in brain areas related to cognitive function, such as the hippocampus. Therefore, they may influence spatial and memory tasks (Park et al., 2000, Moosavi et al., 2007). Indeed, i.c.v insulin administration improves spatial learning and memory performance in young rats. Moreover, insulin increased the BDNF levels in the hippocampus of young rats. However, i.c.v insulin did not improve memory performance in aged rats or increase BDNF levels. It is important to consider evidence suggesting that prior to the appearance of cognitive symptoms, there is a long, silent, cumulative, and dynamic combination of neurochemical and morphological alterations that, under influence of brain insulin resistance, can mediate cognitive dysfunctions (Dickstein et al., 2012).

Accordingly, (Solas et al., 2010) demonstrated that impaired brain insulin signaling in aged animals was associated with altered connections between the cells of the hippocampal network, which might difficult to insulin modulate the mechanisms that facilitate spatial memory performance. Additionally, subfields of the hippocampus have many compartmentalized functions during learning and memory formation. Thus, it has been demonstrated that the CA3 lesioned rats showed impaired performance in the water maze task; however, the CA1 lesioned rats were not impaired. The CA3 subfield is also important for the acquisition and encoding of spatial information in short-term memory with a duration of seconds to minutes (Kesner, 2007). NeuN is generally considered a nuclear antigen (Mullen et al., 1992) which is modulated by the level of synapse activity (Lind et al., 2005). Thus, insulin downstream signaling is able to activate NMDA receptors exerting positive effects on synapse plasticity (Christie et al., 1999), which could be reflected by the increased NeuN fluorescence observed here. Our results showed that insulin increased the fluorescence density of NeuN in the CA1 and DG subfields in young and aged rats; however, the number of NeuN positive cells

in these subfields increased only in aged-insulin group. These differential hippocampal responses to insulin administration possibly indicate that even within a specific region there are different levels of insulin resistance/sensitivity, which is corroborated by the concept of compartmentalized functions. In addition, NeuN counts and fluorescence were proposed to represent distinct functional roles (Lind et al., 2005). The increase in BrdU positive cells in CA1 and CA3 may indicate that insulin increases neurogenesis in aged hippocampus, albeit at this time of neural network disturbance and the dose regimen used did not facilitate the spatial memory. These results may represent a differential modulation of hippocampal morphology by insulin signaling, which is affected by aging.

In summary, aging decreased hippocampal insulin sensitivity regarding lactate metabolism, mitochondrial biogenesis, BDNF expression and neuroplasticity (cell counts and neurogenesis). However, i.c.v insulin administration was effective in improving neuroplasticity in the hippocampus of aged rats.

**Acknowledgements:** This work was supported by Brazilian agencies and grants: CNPq, CAPES, FAPERGS-PPSUS (#09/0068-1), INCT-Excitotoxicity and Neuroprotection (#573677/2008-5). Brasil-Switzerland Program for Science and Technology -CNPq.

**Disclosure of Potential Conflict of Interest:** The authors have nothing to disclose.

#### **Authors' contributions**

Haas CB: performed the animal surgery experiments, biochemical analyses, and wrote the manuscript; Kalinine E: performed biochemistry experiments and insulin administration; Zimmer E: performed behavioral experiments; Brochier A: performed behavioral and biochemical analyses; Hansel G: performed biochemical analyses; Souza DO: provided interpretation of the results and wrote the manuscript; Portela LV:

organized experiments, provided interpretation of the results, and wrote the manuscript;

Muller AP: organized experiments, performed the behavioral and biochemical experiments, and wrote the manuscript.

## References

- Chen SD, Yang DI, Lin TK, Shaw FZ, Liou CW, Chuang YC. 2011. Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1alpha and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia. *Int J Mol Sci* 12(10):7199-215.
- Cheng Z, Tseng Y, White MF. 2010. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. *Trends Endocrinol Metab* 21(10):589-98.
- Christie JM, Wenthold RJ, Monaghan DT. 1999. Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *J Neurochem* 72(4):1523-8.
- Cole GM, Frautschy SA. 2007. The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. *Exp Gerontol* 42(1-2):10-21.
- de la Monte SM, Longato L, Tong M, Wands JR. 2009. Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Investig Drugs* 10(10):1049-60.
- de la Monte SM, Wands JR. 2005. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 7(1):45-61.
- Dickstein DL, Weaver CM, Luebke JI, Hof PR. 2012. Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience*.
- Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, Rodal I, de Yébenes JG, Molina JA, Bermejo F, Carro E. 2008. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging* 29(6):902-12.
- Garrido P, de Blas M, Del Arco A, Segovia G, Mora F. 2012. Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat. *Neurobiol Aging* 33(2):375-82.
- Gispén WH, Biessels GJ. 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23(11):542-9.
- Hofer SM, Berg S, Era P. 2003. Evaluating the interdependence of aging-related changes in visual and auditory acuity, balance, and cognitive functioning. *Psychol Aging* 18(2):285-305.
- Hoyer S. 2004. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol* 490(1-3):115-25.
- Jackson TC, Foster TC. 2009. Regional Health and Function in the hippocampus: Evolutionary compromises for a critical brain region. *Biosci Hypotheses* 2(4):245-251.
- Kesner RP. 2007. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem* 14(11):771-81.
- Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. 2005. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* 79(3):295-302.
- McNay EC. 2007. Insulin and ghrelin: peripheral hormones modulating memory and hippocampal function. *Curr Opin Pharmacol* 7(6):628-32.
- McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. 2010. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem* 93(4):546-53.
- Moosavi M, Naghdi N, Choopani S. 2007. Intra CA1 insulin microinjection improves memory consolidation and retrieval. *Peptides* 28(5):1029-34.

- Moreira TJ, Pierre K, Maekawa F, Repond C, Cebere A, Liljequist S, Pellerin L. 2009. Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 29(7):1273-83.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116(1):201-11.
- Muller AP, Gnoatto J, Moreira JD, Zimmer ER, Haas CB, Lulhier F, Perry ML, Souza DO, Torres-Aleman I, Portela LV. 2011. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus* 21(10):1082-92.
- Muller AP, Tort AH, Gnoatto J, Moreira JD, Vinade ER, Perry ML, Souza DO, Lara DR, Portela LV. 2010. Metabolic and behavioral effects of chronic olanzapine treatment and cafeteria diet in rats. *Behav Pharmacol* 21(7):668-75.
- Muller AP, Zimmer ER, Kalinine E, Haas CB, Oses JP, Martimbianco de Assis A, Galina A, Souza DO, Portela LV. 2012. Physical Exercise Exacerbates Memory Deficits Induced by Intracerebroventricular STZ but Improves Insulin Regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in Mice Synaptosomes. *J Alzheimers Dis*.
- Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. 2000. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav* 68(4):509-14.
- Patten DA, Germain M, Kelly MA, Slack RS. 2010. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2:S357-67.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83(2):346-56.
- Porte D, Jr., Baskin DG, Schwartz MW. 2005. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54(5):1264-76.
- Sims NR, Blass JP. 1986. Expression of classical mitochondrial respiratory responses in homogenates of rat forebrain. *J Neurochem* 47(2):496-505.
- Solas M, Aisa B, Mugueta MC, Del Rio J, Tordera RM, Ramirez MJ. 2010. Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 35(8):1664-73.
- Uranga RM, Bruce-Keller AJ, Morrison CD, Fernandez-Kim SO, Ebenezer PJ, Zhang L, Dasuri K, Keller JN. 2010. Intersection between metabolic dysfunction, high fat diet consumption, and brain aging. *J Neurochem* 114(2):344-61.
- Whitwell JL, Jack CR, Jr. 2005. Comparisons between Alzheimer disease, frontotemporal lobar degeneration, and normal aging with brain mapping. *Top Magn Reson Imaging* 16(6):409-25.
- Yin F, Boveris A, Cadenas E. 2012. Mitochondrial Energy Metabolism and Redox Signaling in Brain Aging and Neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*.



## **Legends of Figures:**

### **1) Extracellular fluid lactate levels after insulin i.c.v administration and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in hippocampus**

A) Insulin i.c.v (20 mU) increased aECF lactate levels in hippocampus of young but not in aged animals relative to basal levels (\*> basal levels,  $p < 0.05$ ). B) Five days insulin i.c.v administration decreased the basal and succinate stimulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in hippocampus (\*aged-insulin < other groups; one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test  $p < 0.05$ ). Insulin i.c.v improved the effect of insulin (10 ng/ml added to incubation medium) in decreasing mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in hippocampus (\*young insulin < young vehicle; t-test  $p < 0.05$ ). Insulin i.c.v improved the effect of insulin (100 ng/ml added to incubation medium) in decreasing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in hippocampus (\*young and aged insulin < young and aged vehicle; one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test  $p < 0.05$ ). C) Aged animals showed decreased immunocontent of PGC1- $\alpha$  in hippocampus when compared to young-vehicle animals (Young-vehicle and insulin > aged-vehicle and insulin; two-way ANOVA  $p < 0.05$ ) and insulin had no effect. Insulin i.c.v increased the immunocontent of PGC1- $\alpha$  in hippocampus of young animals (\*young insulin > young vehicle; t-test  $p < 0.05$ ).

### **2) Insulin i.c.v administration increases neurogenesis in aged animals**

A) Insulin i.c.v increased the number of BrdU positive cells in aged animals (\*aged-insulin > aged-vehicle; t-test  $p < 0.05$ ). B) Aging decreased the number of BrdU positive cells in CA3 subfield of hippocampus. Insulin i.c.v increased the number of BrdU positive cells in aged animals (\*aged-insulin > other groups; one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test  $p < 0.05$ ). C) Neither aging nor insulin administration

affect BrdU positive cells in DG. D) BrdU and NeuN labeling representative images of CA1 subregion.

### **3) Spatial learning and memory performance and BDNF levels in the hippocampus.**

A) The latency to find the platform for five days in the Morris water maze task (MWM). The young-insulin animals spent less time finding the platform by the third day in the acquisition phase compared to the other groups (\*young-insulin < other groups; repeated-measures analysis of variance  $p < 0.05$ ). B) The young-insulin animals increased the time spent in the target quadrant during the probe day compared to the other groups (\*young-insulin < other groups; one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test  $p < 0.05$ ). C) The young-insulin animals showed increased hippocampal BDNF levels compared to the young vehicle animals (\*young insulin > young vehicle; one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test  $p < 0.05$ ) (n= 10-12).

### **4) Cellular density in CA1, CA3 and the dentate gyrus of the hippocampus**

A-D) Representative images of cresyl violet staining in the CA1 subfield. Aging decreased (C) and insulin increased the cellular density in the young and aged animals (B and D). E-H) Representative images of cresyl violet staining in the CA3 subfield. Aging decreased (G) and insulin had no effect on the cellular density in the young and aged animals (F-H). I-L) Representative images of cresyl violet staining in the dentate gyrus subfield. Aging decreased (K) and insulin increased the cellular density in the aged animals (L) (n= 4-6).

## **5) Morphological effects of aging and insulin i.c.v administration in CA1 subfield of hippocampus**

A) Aging decreased the fluorescence density of the neuronal marker, NeuN. Insulin i.c.v increased the fluorescence density in young and aged animals (\*young-insulin>young-vehicle and aged-insulin>aged-vehicle; t-test  $p<0.05$ ). B) The fluorescence density of astrocytic marker GFAP was not altered by aging or insulin i.c.v administration. C) The fluorescence density of nuclei marker DAPI, was increased by insulin in the young and aged animals. (\*young-insulin>young-vehicle and aged- insulin>aged-vehicle; one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test  $p<0.05$ ) (n= 4-6). D) Aging decreased the number of NeuN positive cells and insulin i.c.v increased the number of NeuN positive cells in and aged animals (\*aged-vehicle < young- vehicle, young-insulin and aged-insulin; one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test  $p<0.05$ ). E). The GFAP positive cell was not altered by aging or insulin i.c.v. F) Aging decreased the number of DAPI positive cells (\*aged-vehicle < young-vehicle, young-insulin and aged-insulin; one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test  $p<0.05$ ). G) NeuN (red), GFAP (green) and DAPI (blue) labeling representative images of CA1 subregion.

## **6) Morphological effects of aging and insulin i.c.v administration in the CA3 of the hippocampus**

A) Aging decreased the fluorescence density of the neuronal marker, NeuN. Insulin i.c.v had no effect on the fluorescence density in young and aged animals (\*young-vehicle and young-insulin> aged-vehicle and aged-insulin; t-test  $p<0.05$ ). The fluorescence density of astrocytic marker, GFAP, was not altered by aging or insulin i.c.v administration. C) The fluorescence density of nuclei marker DAPI, was not altered by insulin in the young and aged animals (n= 4-6). D) Aging decreased the NeuN positive

cells (\*aged-vehicle < young- vehicle, young-insulin and aged-insulin; one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test  $p < 0.05$ ). E) The number of GFAP positive cells was not altered by aging or insulin icv administration. F) DAPI positive cells was not altered by insulin in the young and aged animals (n= 4-6). G) NeuN (red), GFAP (green) and DAPI (blue) labeling representative images of CA3 subregion.

### **7) Morphological effects of aging and insulin i.c.v administration in the dentate gyrus of the hippocampus**

A) Aging decreased the fluorescence density of the neuronal marker, NeuN. Insulin i.c.v increased the fluorescence density in the aged animals (\*aged- insulin>aged-vehicle; t-test  $p < 0.05$ ). B) The fluorescence density of astrocytic marker GFAP was not altered by aging or insulin i.c.v. C) The fluorescence density of DAPI was not altered by aging or insulin i.c.v administration. D) Aging decreased the number of NeuN positive cells and insulin icv increased the number of NeuN positive cells in aged animals (\*aged insulin>aged vehicle; t-test  $p < 0.05$ ). E) Aging decreased the number of GFAP positive cells (\*young-vehicle and young-insulin> aged-vehicle and aged-insulin; two-way ANOVA  $p < 0.05$ ) (n= 4-6). F) The number of DAPI positive cells was not altered by insulin or aging (n= 4-6). G) NeuN (red), GFAP (green) and DAPI (blue) labeling representative images of dentate gyrus subregion.

Figure 1:

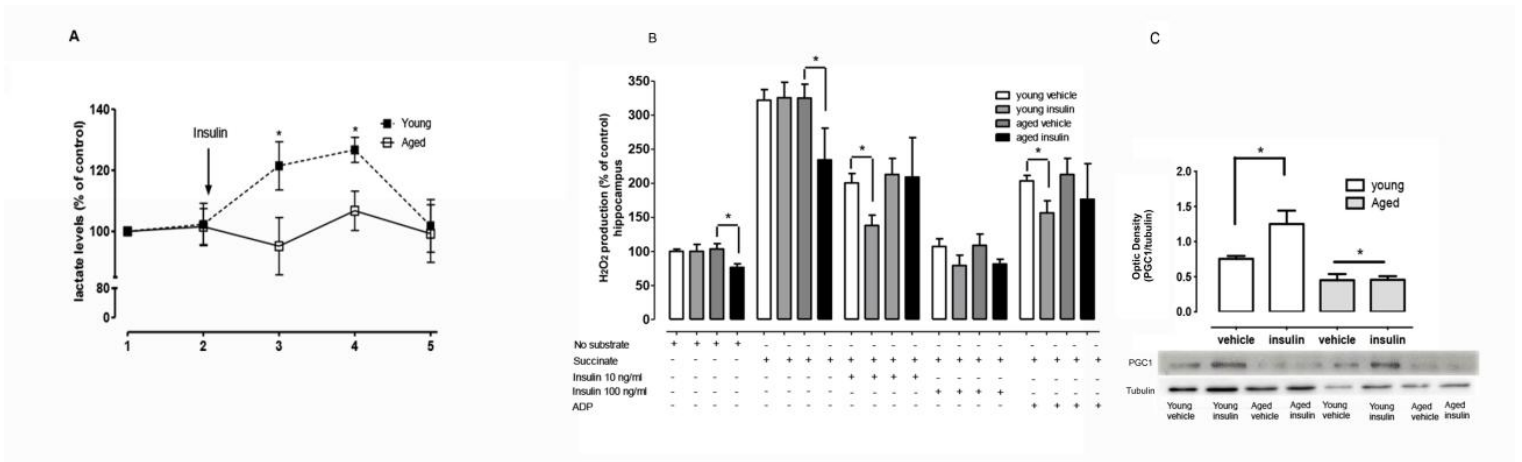
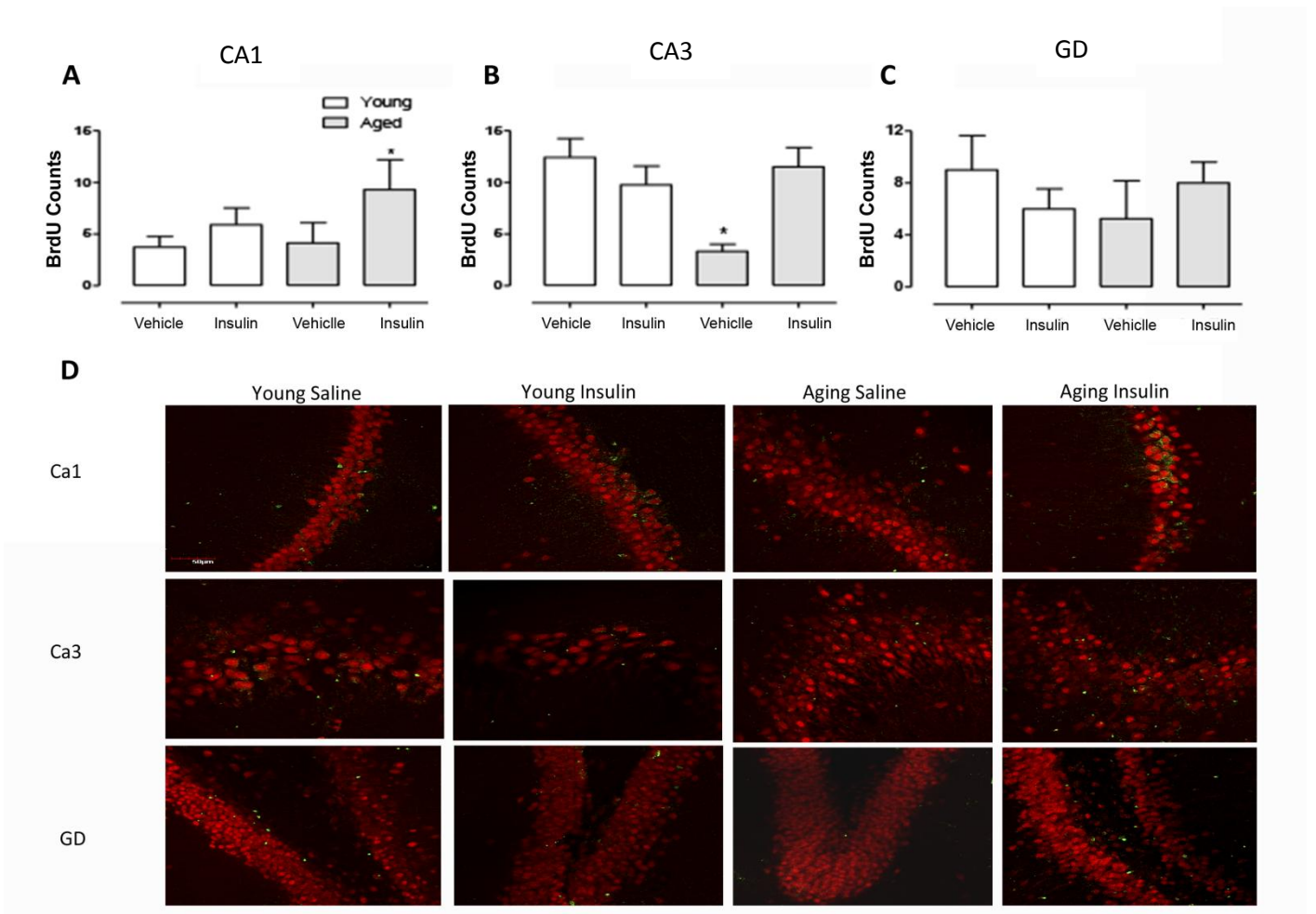
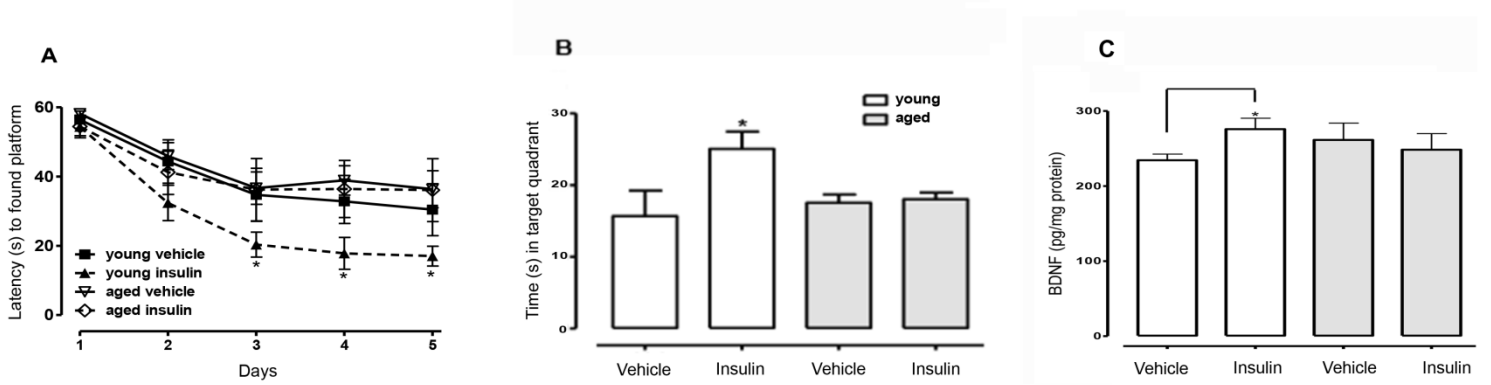


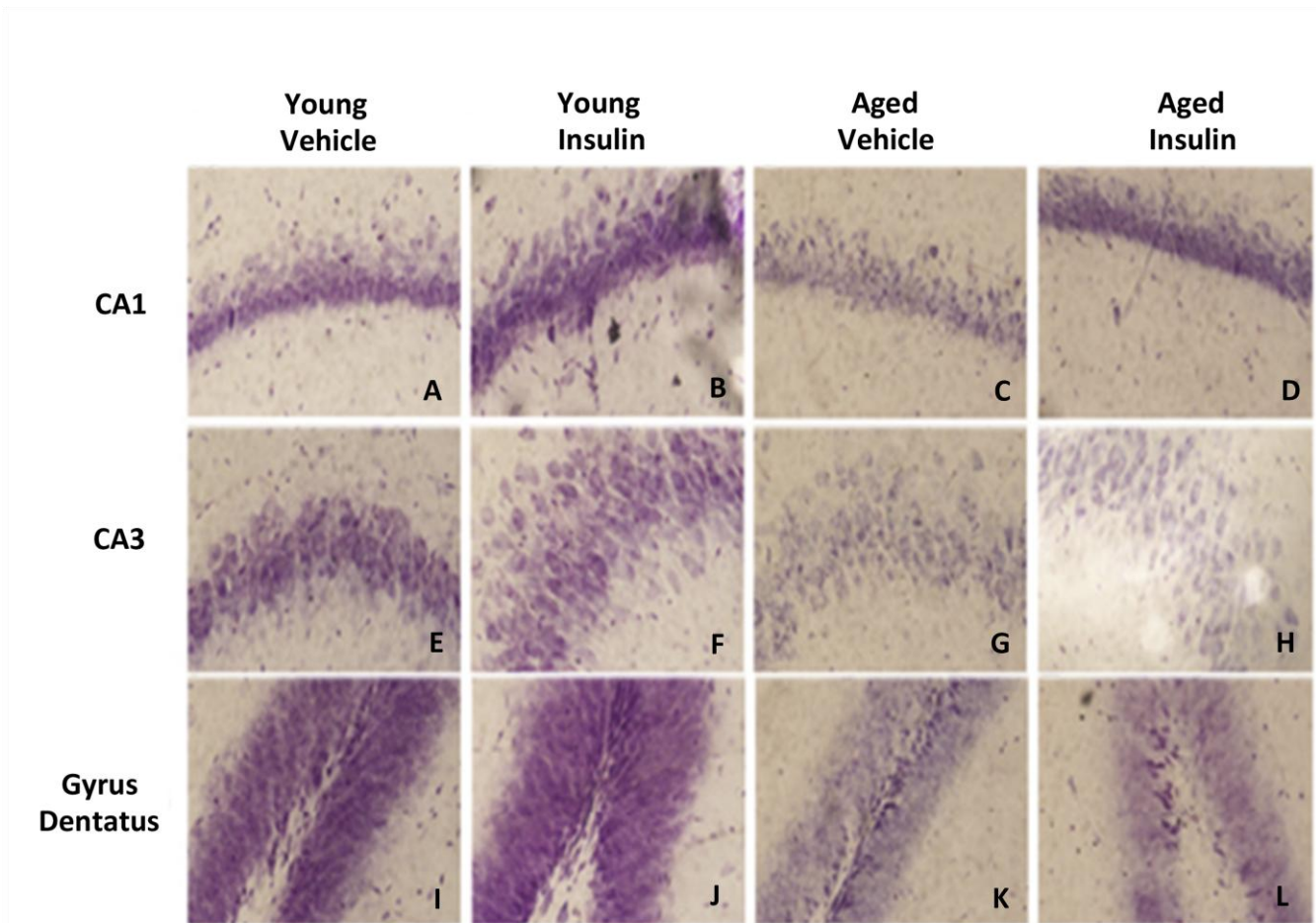
Figure 2:



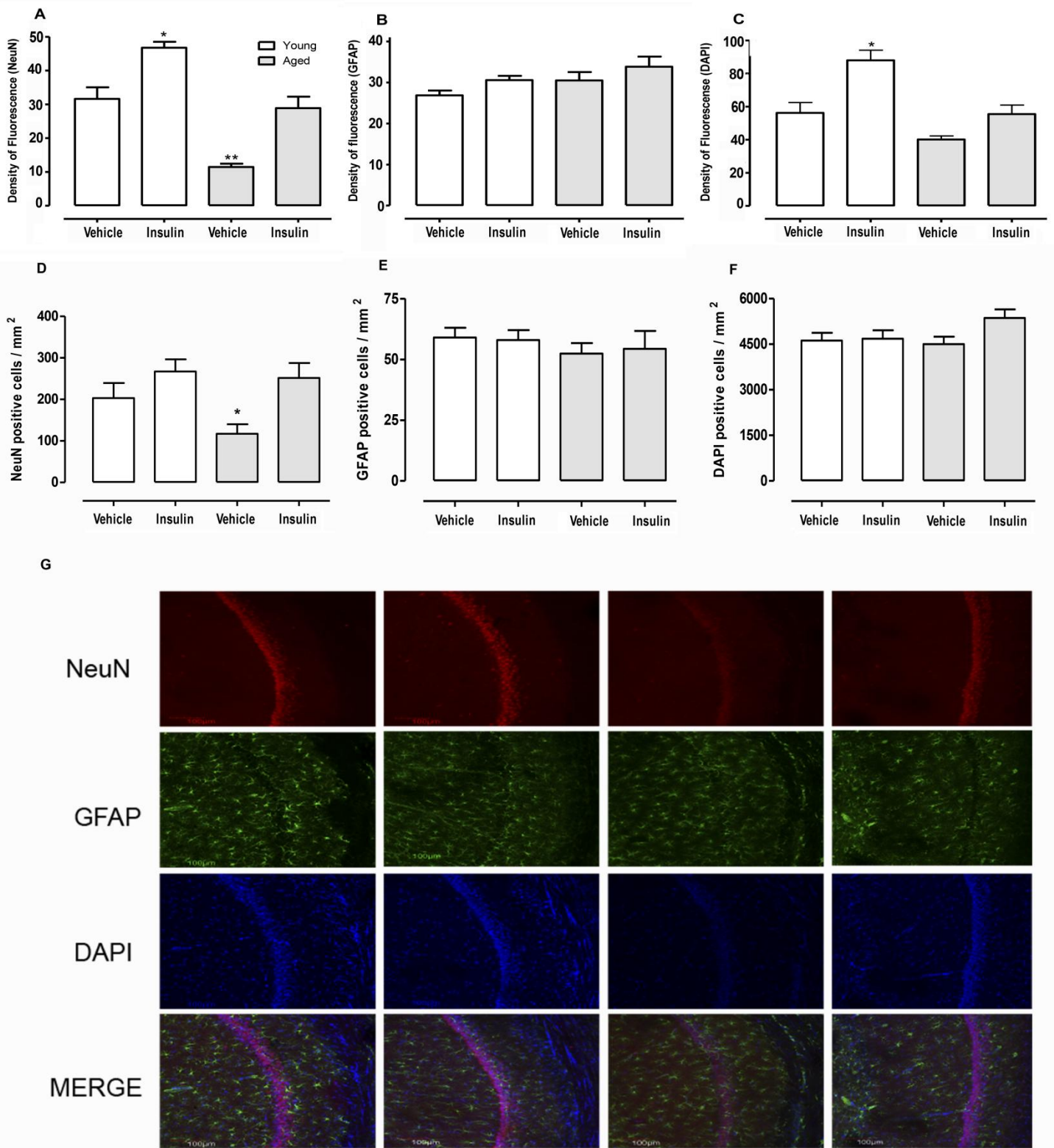
**Figure 3:**



**Figure 4:**

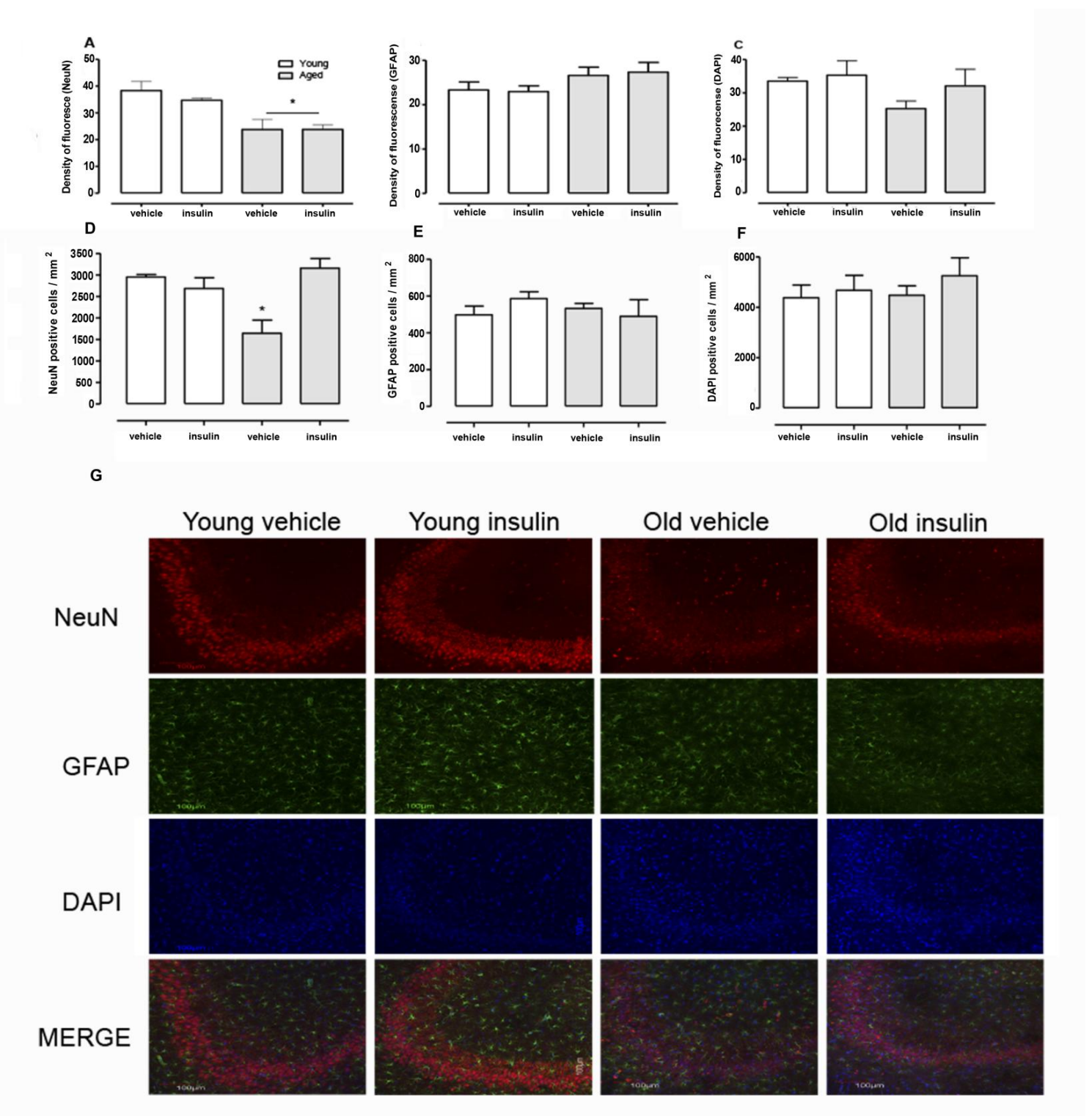


**Figure 5:**



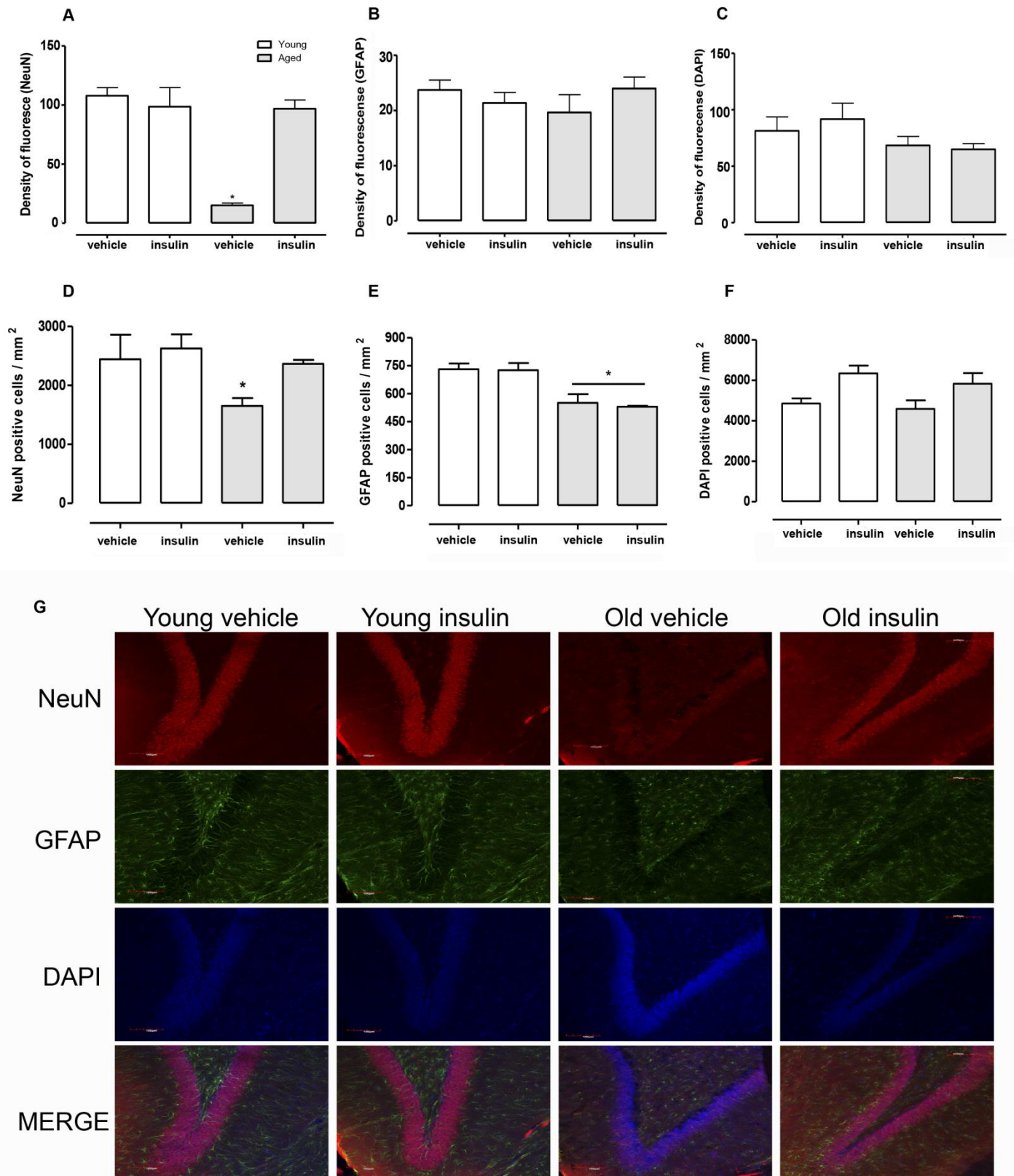


**Figure 6:**





**Figure 7:**



### **PARTE III**

## 1. DISCUSSÃO

Nesse trabalho nós demonstramos que 10 e 20 minutos após o tratamento com insulina ICV, durante cinco dias, os níveis de lactato, no líquido extracelular do hipocampo, aumentaram somente nos ratos jovens. E que, após o tratamento, houve melhora do controle da homeostase da glicose periférica em animais jovens, mas não em animais velhos. Além disso, a insulina diminuiu a produção de  $H_2O_2$  nos animais jovens, e também nos animais velhos. O comportamento alimentar e o peso corporal também foram afetados pelo tratamento. Tanto os ratos jovens, quanto os velhos apresentaram diminuição do peso corporal e da ingestão de alimentos. A insulina ICV, ainda, foi capaz de aumentar a contagem do marcador de neurogênese, BrdU, nas sub-regiões Ca1 e Ca3, do hipocampo, nos animais velhos e também foi capaz de aumentar o imunoconteúdo de BDNF no hipocampo de animais jovens. Dessa forma, o desempenho no labirinto aquático de Morris, também melhorou nos animais jovens. O tratamento também alterou a plasticidade neuronal e astrocitária em ambas as faixas etárias estudadas.

A melhora na capacidade de regular a glicose periférica, causada pela insulina, nos animais jovens, foi realizada pela medida do GTT, teste freqüentemente utilizado na clínica médica. Entretanto, essa melhora não foi observada nos animais velhos. Foi proposto que a ação da insulina no SNC é necessária para causar a supressão rápida da produção de glicose hepática (Ramnanan et al., 2012). Além disso, crescem as evidências de que a DA é originalmente uma doença metabólica, já que nessa doença ocorrem prejuízos na utilização de glicose e produção de energia no cérebro. Isso porque essas anormalidades metabólicas estão ligadas a resistência da sinalização de insulina e IGF-I no SNC. Tal alteração também é encontrada no envelhecimento

cerebral o que acaba contribuindo para o prejuízo das funções cognitivas (de la Monte, 2012). Dessa forma, esse prejuízo encontrado na regulação da glicose no envelhecimento, poderia estar relacionado a uma falha na sinalização da insulina cerebral.

Ainda estudando o metabolismo energético cerebral e investigando os efeitos da insulina sobre substratos alternativos, nós mostramos pela primeira vez que o cérebro envelhecido não é responsivo à insulina com relação ao aumento dos níveis de lactato. Esse resultado sugere um novo mecanismo de resistência cerebral de insulina envolvendo o metabolismo do lactato. Já foi demonstrado que a presença de insulina aumenta a expressão do transportador MCT2 em cultura de neurônios. Esse transportador é responsável pelo transporte de ácidos monocarboxílicos, inclusive do lactato nas células neuronais. Essa expressão aumentada ocorre pela ativação da via do RI, PI3K-Akt-mTOR, que fosforila a proteína ribossomal S6, aumentando então a transcrição da proteína MCT2. Dessa forma, a sinalização cerebral de insulina contribui para utilização e produção de outros substratos energéticos que não a glicose, em situações de alta demanda energética, como por exemplo, no aumento da atividade sináptica (Chenal et al., 2008).

Assim, nossos dados sugerem que a administração de insulina ICV, aumenta a disponibilidade de lactato no hipocampo dos ratos jovens, mas isso não ocorre nos velhos. É possível que, no envelhecimento, com a dessensibilização dos RIs, menos transportadores MCT2 sejam expressos nos neurônios, prejudicando a utilização de substratos alternativos nessas células. Entretanto, é necessário que mais estudos sejam realizados a fim de investigar essa proposta.

As deficiências encontradas no metabolismo energético cerebral durante o envelhecimento são um dos fatores responsáveis pelo aumento de disfunções

mitocondriais que resultam em estresse oxidativo e liberação de citocinas pró-inflamatórias (de la Monte, 2012). Logo, é importante que se estude o papel da resistência da sinalização de insulina no cérebro sobre parâmetros mitocondriais. A respiração mitocondrial produz fisiologicamente  $H_2O_2$ , podendo exercer efeitos fisiológicos e patológicos no SNC (Patten et al., 2010). Nesse trabalho nós observamos que o envelhecimento não altera a produção basal de  $H_2O_2$  pelas mitocôndrias hipocâmpais. O tratamento ICV com insulina durante cinco dias foi capaz de diminuir a produção basal de  $H_2O_2$  no hipocampo dos ratos velhos.

A insulina ICV também potencializou a regulação da produção de  $H_2O_2$  quando uma dose de 10 ng/mL foi utilizada diretamente na preparação hipocâmpal dos ratos jovens. Por outro lado, na dose de 100 ng/mL o efeito neuroprotetor foi similar em ambas as idades. A capacidade da insulina de modular a produção de  $H_2O_2$  em preparações de cérebro já havia sido previamente demonstrada pelo nosso grupo (Muller et al., 2012c). O efeito neuroprotetor da insulina sobre o estresse oxidativo já havia sido previamente demonstrado (Duarte et al., 2004) embora nenhum resultado havia mostrado até agora o efeito desse hormônio diretamente sobre a produção de  $H_2O_2$ .

Outra proteína importante envolvida na biogênese mitocondrial já citada na introdução é a PGC1- $\alpha$ . O termo biogênese mitocondrial refere-se à formação de novas mitocôndrias nas células. Esse processo envolve a regulação coordenada da transcrição de proteínas da cadeia respiratória a partir do DNA nuclear e mitocondrial (Knott and Bossy-Wetzel, 2010). Nós mostramos que o envelhecimento, *per se*, diminui o imunoconteúdo hipocâmpal dessa proteína e que a expressão desta é responsiva à presença de insulina somente nos animais jovens. Esse resultado leva a uma discussão sobre uma possível ligação na expressão de PGC1- $\alpha$  e sinalização de insulina sugerindo

um novo papel desse hormônio sobre a função mitocondrial que parece estar prejudicada durante o envelhecimento. Entretanto, essa ligação também precisa ser melhor estudada.

Nossos resultados também mostraram que o tratamento com insulina diminuiu a ingestão alimentar em 70% nos ratos jovens e 35% nos velhos e, consistente com esse dado, o tratamento também diminuiu 34% do peso corporal nos jovens e 23% nos velhos. Kamal e colaboradores demonstraram que a infusão de insulina ICV, contínua, utilizando uma minibomba osmótica, causa uma redução inicial na ingestão de alimentos e peso corporal em ratos adultos, corroborando com os nossos dados, mas essas alterações foram atenuadas em 12 semanas de infusão (Kamal et al., 2012). Outros autores também já haviam relatado o efeito anorexígeno da administração de insulina diretamente no cérebro (Air et al., 2002, Carvalheira et al., 2003).

O efeito anorexígeno da insulina também foi verificado em humanos, e, mesmo com uma administração intranasal única, houve diminuição na quantidade de calorias ingeridas pelos pacientes 100 minutos após o tratamento (Jauch-Chara et al., 2012). Assim, é possível visualizar que a sinalização de insulina no controle da saciedade também está prejudicada no envelhecimento, e que, mesmo com o tratamento realizado, os efeitos benéficos da insulina sobre a ingestão de alimento e o peso corporal são mais efetivos nos animais jovens.

Além disso, esse estudo mostrou que a insulina atua como um fator neurotrófico aumentando os níveis hipocámpais de BDNF nos animais jovens, mas não nos animais velhos. Esse efeito está relacionado com a melhora no desempenho dos animais velhos no labirinto aquático de Morris, logo os níveis aumentados de BDNF atuam melhorando processos de aprendizado e memória. Entretanto, a insulina não atuou sobre nenhum

desses parâmetros nos animais velhos, mostrando que seu efeito sobre o BDNF é prejudicado em situações de resistência cerebral à sinalização de insulina.

Tem sido relatado que ratos velhos possuem seu desempenho, freqüentemente, prejudicado na tarefa do labirinto aquático de Morris (Rosenzweig and Barnes, 2003) e que o tratamento ICV com insulina é reconhecido como facilitador de aprendizado em ratos jovens (Park et al., 2000, Moosavi et al., 2007, Chiu et al., 2008), porém, o efeito em ratos velhos ainda não havia sido testado no protocolo desse teste comportamental, tampouco sobre o imunoconteúdo hipocampal de BDNF, cuja sinalização é essencial para que ocorram processos de aprendizado e memória.

Sendo o BDNF uma molécula chave para o funcionamento e integridade estrutural do hipocampo, o aumento da expressão dessa proteína com a presença da insulina, nos animais jovens, é um resultado relevante. De acordo com outros trabalhos, nossos resultados mostraram que o imunoconteúdo dessa proteína não sofre alterações durante o envelhecimento no hipocampo. Entretanto, a quantificação do RNA mensageiro do BDNF está diminuída 45% em ratos de 24 meses de idades (Perovic et al., 2012).

Nesse trabalho nós também investigamos os efeitos neurotróficos da insulina sobre células neurais. Através da obtenção de imagens representativas, utilizando a coloração de Violeta de Cresil, foi possível visualizar que o envelhecimento diminui a densidade celular nas três sub-regiões hipocampais estudadas. Na sub-região CA1, o tratamento aumentou a densidade celular em todos os grupos estudados e na sub-região do GD somente nos animais velhos. A partir desses resultados decidimos marcar especificamente neurônios e astrócitos, para avaliar os tipos celulares afetados pelo envelhecimento e pela insulina.

O marcador utilizado para neurônios foi anti-NeuN e para astrócitos anti-GFAP. NeuN é um marcador que é modulado pelos níveis de atividade sináptica (Mullen et al., 1992). Tratamentos que causam efeitos positivos sobre a plasticidade sináptica podem aumentar a fluorescência da marcação desse anticorpo (Lind et al., 2005). GFAP é uma proteína do citoesqueleto dos astrócitos e a mudança em sua fluorescência pode estar relacionada à reatividade glial (von Bohlen und Halbach, 2011). Assim, o tratamento com insulina aumentou a fluorescência de NeuN em jovens e velhos, na sub-região CA1 e somente nos velhos no GD, e a fluorescência de GFAP não foi alterada nem com a idade nem com o tratamento.

Nós também avaliamos a quantidade de núcleos neuronais. A contagem de marcações NeuN positivas se mostrou alterada tanto com a idade, quanto com o tratamento. Nas três sub-regiões estudadas, foi observada que no envelhecimento houve diminuição dessa contagem e a insulina aumentou esse parâmetro somente nos ratos velhos. Assim, os neurônios dos ratos velhos parecem ser mais sensíveis aos efeitos neurotróficos do tratamento com insulina ICV, bem como as três sub-regiões estudadas apresentam diferentes sensibilidades à dose utilizada de insulina.

Já foi demonstrado que a resistência à sinalização de insulina em animais velhos está associada a mudanças nas conexões entre as células do hipocampo, o que poderia sugerir uma dificuldade da insulina em modular a conectividade neural (Solas et al., 2010). Além disso, também já foi demonstrado que ratos com a região CA3 lesionada mostraram prejuízos na memória espacial, enquanto que lesões na CA1 não causaram tais prejuízos. Assim a CA3 é importante para aquisição e processamento da informação da memória espacial na memória de curta duração que dura de segundos a minutos (Kesner, 2007). E nossos resultados sugerem que essa sub-região parece ser bastante sensível à dose utilizada de insulina, mesmo no envelhecimento.



A contagem de núcleos neuronais e a quantificação da fluorescência de NeuN representam diferentes resultados. Esses resultados demonstram que as diferentes respostas do hipocampo à presença de insulina refletem diferentes níveis de sensibilidade/resistência à sinalização de insulina, o que corrobora com a concepção de que o hipocampo é uma região cerebral com funções altamente compartimentalizadas, (Lind et al., 2005).

Para tentar entender melhor o aumento de núcleos neuronais com a presença de insulina, nós utilizamos o marcador de proliferação celular BrdU. A interpretação do BrdU não é algo trivial. Existe uma discussão sobre o fato de que a incorporação dos análogos de timidina no DNA durante a fase S do ciclo celular não seria um evento que ocorreria apenas na proliferação celular, pois muitos processos celulares podem resultar na síntese de DNA, sem que a célula esteja em mitose, como em processos de reparo e apoptose. Entretanto uma dose até 50mg/kg não é detectada em outros processos que não seja o de proliferação celular. Dessa forma, o BrdU é um marcador bastante aceito e utilizado, sendo sua principal vantagem, o fato de ele não requerer nenhum conhecimento prévio sobre as células a serem estudadas e ainda poder ser utilizado em diferentes espécies e tipos celulares (Landgren and Curtis, 2011).

Assim, a insulina causou um aumento nas marcações BrdU positivas nas sub-regiões CA1 e CA3 do hipocampo dos ratos velhos, sugerindo que houve aumento de neurogênese nesses animais. Entretanto, o tratamento nessa idade não foi capaz de facilitar a memória espacial. Isso porque, provavelmente, mesmo com novos neurônios, os prejuízos nas conexões neurais, no hipocampo, já estão bastante avançados. Esses resultados também representam uma modulação diferencial na morfologia hipocampal pela sinalização de insulina que é muito afetada pelo envelhecimento cerebral.

De uma maneira geral o envelhecimento diminuiu a sensibilidade hipocampal à insulina no que se refere ao metabolismo do lactato, biogênese, BDNF e neuroplasticidade (numero de células neurais e neurogênese). Entretanto, a administração de insulina ICV foi efetiva em aumentar a neuroplasticidade no hipocampo de ratos envelhecidos. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a sinalização de insulina cerebral é crítica para a funcionalidade e morfologia do hipocampo tanto em ratos jovens quanto em velhos.

## **2. PERSPECTIVAS**

Considerando os resultados desse estudo, e o fato de que mais estudos experimentais são importantes para elucidar os mecanismos de neuroproteção da insulina no SNC, e que ainda, a neuroinflamação é um processo que contribui para a patogênica de doenças neurodegenerativas e que os mecanismos de neuroproteção da insulina relacionados à neuroinflamação ainda não são conhecidos, nossas perspectivas são:

- Avaliar os efeitos cerebrais da insulina sobre parâmetros neuroinflamatórios no envelhecimento.
- Avaliar os efeitos neuroprotetores da insulina no SNC utilizando um modelo crônico de neuroinflamação com a droga LPS, já que o envelhecimento é um modelo clássico de neuroinflamação.

## REFERÊNCIAS

- Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O. and Kokaia, Z., 2009. Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci.* 29, 4408-4419.
- Air, E. L., Benoit, S. C., Clegg, D. J., Seeley, R. J. and Woods, S. C., 2002. Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. *Endocrinology.* 143, 2449-2452.
- Amrein, I., Isler, K. and Lipp, H. P., 2011. Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *Eur J Neurosci.* 34, 978-987.
- Banks, W. A., Jaspan, J. B., Huang, W. and Kastin, A. J., 1997. Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides.* 18, 1423-1429.
- Bingham, E. M., Hopkins, D., Smith, D., Pernet, A., Hallett, W., Reed, L., Marsden, P. K. and Amiel, S. A., 2002. The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes.* 51, 3384-3390.
- Carvalho, J. B., Ribeiro, E. B., Araujo, E. P., Guimaraes, R. B., Telles, M. M., Torsoni, M., Gontijo, J. A., Velloso, L. A. and Saad, M. J., 2003. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia.* 46, 1629-1640.
- Cavanagh, B. L., Walker, T., Norazit, A. and Meedeniya, A. C., 2011. Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules.* 16, 7980-7993.
- Chen, S. D., Yang, D. I., Lin, T. K., Shaw, F. Z., Liou, C. W. and Chuang, Y. C., 2011. Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1alpha and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia. *Int J Mol Sci.* 12, 7199-7215.
- Chenal, J., Pierre, K. and Pellerin, L., 2008. Insulin and IGF-1 enhance the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *Eur J Neurosci.* 27, 53-65.
- Cheng, Z., Tseng, Y. and White, M. F., Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.*
- Chiu, S. L., Chen, C. M. and Cline, H. T., 2008. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. *Neuron.* 58, 708-719.
- Chowers, I., Lavy, S. and Halpern, L., 1966. Effect of insulin administered intracisternally on the glucose level of the blood and the cerebrospinal fluid in vagotomized dogs. *Exp Neurol.* 14, 383-389.
- Christie, J. M., Wenthold, R. J. and Monaghan, D. T., 1999. Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *J Neurochem.* 72, 1523-1528.
- Cole, G. M. and Frautschy, S. A., 2007. The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. *Exp Gerontol.* 42, 10-21.
- Craft, S. and Watson, G. S., 2004. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol.* 3, 169-178.
- Currais, A. and Maher, P., 2012. Functional consequences of age-dependent changes in glutathione status in the brain. *Antioxid Redox Signal.*
- de la Monte, S. M., 2012. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 9, 35-66.
- de la Monte, S. M., Longato, L., Tong, M. and Wands, J. R., 2009. Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Investig Drugs.* 10, 1049-1060.
- de la Monte, S. M. and Wands, J. R., 2005. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 7, 45-61.
- Dickstein, D. L., Weaver, C. M., Luebke, J. I. and Hof, P. R., 2012. Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience.*

- Dietrich, M. O., Spuch, C., Antequera, D., Rodal, I., de Yebenes, J. G., Molina, J. A., Bermejo, F. and Carro, E., 2008. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging*. 29, 902-912.
- Driscoll, I., Hong, N. S., Craig, L. A., Sutherland, R. J. and McDonald, R. J., 2008. Enhanced cell death and learning deficits after a mini-stroke in aged hippocampus. *Neurobiol Aging*. 29, 1847-1858.
- Duarte, A. I., Moreira, P. I. and Oliveira, C. R., 2012. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res*. 2012, 384017.
- Duarte, A. I., Proenca, T., Oliveira, C. R., Santos, M. S. and Rego, A. C., 2006. Insulin restores metabolic function in cultured cortical neurons subjected to oxidative stress. *Diabetes*. 55, 2863-2870.
- Duarte, A. I., Santos, M. S., Seica, R. and de Oliveira, C. R., 2003. Insulin affects synaptosomal GABA and glutamate transport under oxidative stress conditions. *Brain Res*. 977, 23-30.
- Duarte, A. I., Santos, M. S., Seica, R. and Oliveira, C. R., 2004. Oxidative stress affects synaptosomal gamma-aminobutyric acid and glutamate transport in diabetic rats: the role of insulin. *Diabetes*. 53, 2110-2116.
- Fernandez, A. M. and Torres-Aleman, I., 2012. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 13, 225-239.
- Foster, K. A., Margraf, R. R. and Turner, D. A., 2008. NADH hyperoxidation correlates with enhanced susceptibility of aged rats to hypoxia. *Neurobiol Aging*. 29, 598-613.
- Fulop, T., Larbi, A. and Douzief, N., 2003. Insulin receptor and ageing. *Pathol Biol (Paris)*. 51, 574-580.
- Gandhi, S. and Abramov, A. Y., 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2012, 428010.
- Garrido, P., de Blas, M., Del Arco, A., Segovia, G. and Mora, F., 2012. Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat. *Neurobiol Aging*. 33, 375-382.
- Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z. and Ahmadiani, A., 2013. Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol*. 47, 145-171.
- Gispén, W. H. and Biessels, G. J., 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci*. 23, 542-549.
- Gold, P. E., 2005. Glucose and age-related changes in memory. *Neurobiol Aging*. 26 Suppl 1, 60-64.
- Halliwel, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 97, 1634-1658.
- Hofer, S. M., Berg, S. and Era, P., 2003. Evaluating the interdependence of aging-related changes in visual and auditory acuity, balance, and cognitive functioning. *Psychol Aging*. 18, 285-305.
- Hoyer, S., 2004. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol*. 490, 115-125.
- Jackson, T. C. and Foster, T. C., 2009. Regional Health and Function in the hippocampus: Evolutionary compromises for a critical brain region. *Biosci Hypotheses*. 2, 245-251.
- Jauch-Chara, K., Friedrich, A., Rezmer, M., Melchert, U. H., H. G. S.-E., Hallschmid, M. and Oltmanns, K. M., 2012. Intranasal insulin suppresses food intake via enhancement of brain energy levels in humans. *Diabetes*. 61, 2261-2268.
- Kamal, A., Ramakers, G. M., Gispén, W. H. and Biessels, G. J., 2012. Effect of chronic intracerebroventricular insulin administration in rats on the peripheral glucose metabolism and synaptic plasticity of CA1 hippocampal neurons. *Brain Res*. 1435, 99-104.
- Kesner, R. P., 2007. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem*. 14, 771-781.
- Kilbride, S. M., Telford, J. E. and Davey, G. P., 2008. Age-related changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and bioenergetics in rat brain synaptosomes. *Biochim Biophys Acta*. 1777, 783-788.

- Knott, A. B. and Bossy-Wetzel, E., 2010. Impact of nitric oxide on metabolism in health and age-related disease. *Diabetes Obes Metab.* 12 Suppl 2, 126-133.
- Landgren, H. and Curtis, M. A., 2011. Locating and labeling neural stem cells in the brain. *J Cell Physiol.* 226, 1-7.
- Lee, S. W., Clemenson, G. D. and Gage, F. H., 2012. New neurons in an aged brain. *Behav Brain Res.* 227, 497-507.
- Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J. and Schilling, K., 2005. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res.* 79, 295-302.
- Mattson, M. P., Maudsley, S. and Martin, B., 2004. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev.* 3, 445-464.
- McEwen, B. S. and Reagan, L. P., 2004. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol.* 490, 13-24.
- McNay, E. C., 2007. Insulin and ghrelin: peripheral hormones modulating memory and hippocampal function. *Curr Opin Pharmacol.* 7, 628-632.
- McNay, E. C., Ong, C. T., McCrimmon, R. J., Cresswell, J., Bogan, J. S. and Sherwin, R. S., Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem.*
- McNay, E. C., Ong, C. T., McCrimmon, R. J., Cresswell, J., Bogan, J. S. and Sherwin, R. S., 2010. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem.* 93, 546-553.
- Mongiati, L. A. and Schinder, A. F., 2011. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *Eur J Neurosci.* 33, 1055-1061.
- Moosavi, M., Naghdi, N. and Choopani, S., 2007. Intra CA1 insulin microinjection improves memory consolidation and retrieval. *Peptides.* 28, 1029-1034.
- Moosavi, M., Naghdi, N., Maghsoudi, N. and Zahedi Asl, S., 2006. The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. *Horm Behav.* 50, 748-752.
- Moreira, T. J., Pierre, K., Maekawa, F., Repond, C., Cebere, A., Liljequist, S. and Pellerin, L., 2009. Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29, 1273-1283.
- Mullen, R. J., Buck, C. R. and Smith, A. M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 116, 201-211.
- Muller, A. P., Fernandez, A. M., Haas, C., Zimmer, E., Portela, L. V. and Torres-Aleman, I., 2012a. Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Mol Cell Neurosci.* 49, 9-12.
- Muller, A. P., Gnoatto, J., Moreira, J. D., Zimmer, E. R., Haas, C. B., Lulhier, F., Perry, M. L., Souza, D. O., Torres-Aleman, I. and Portela, L. V., 2011. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus.* 21, 1082-1092.
- Muller, A. P., Tort, A. H., Gnoatto, J., Moreira, J. D., Vinade, E. R., Perry, M. L., Souza, D. O., Lara, D. R. and Portela, L. V., 2010. Metabolic and behavioral effects of chronic olanzapine treatment and cafeteria diet in rats. *Behav Pharmacol.* 21, 668-675.
- Muller, A. P., Zimmer, E. R., Kalinine, E., Haas, C. B., Oses, J. P., Martimbianco de Assis, A., Galina, A., Souza, D. O. and Portela, L. V., 2012b. Physical Exercise Exacerbates Memory Deficits Induced by Intracerebroventricular STZ but Improves Insulin Regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in Mice Synaptosomes. *J Alzheimers Dis.*
- Muller, A. P., Zimmer, E. R., Kalinine, E., Haas, C. B., Oses, J. P., Martimbianco de Assis, A., Galina, A., Souza, D. O. and Portela, L. V., 2012c. Physical exercise exacerbates memory deficits induced by intracerebroventricular STZ but improves insulin regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in mice synaptosomes. *J Alzheimers Dis.* 30, 889-898.
- Navarro, A. and Boveris, A., 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292, C670-686.

- Ott, A., Stolk, R. P., van Harskamp, F., Pols, H. A., Hofman, A. and Breteler, M. M., 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*. 53, 1937-1942.
- Park, C. R., 2001. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*. 25, 311-323.
- Park, C. R., Seeley, R. J., Craft, S. and Woods, S. C., 2000. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav*. 68, 509-514.
- Patten, D. A., Germain, M., Kelly, M. A. and Slack, R. S., 2010. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*. 20 Suppl 2, S357-367.
- Pellerin, L., 2008. Brain energetics (thought needs food). *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 11, 701-705.
- Pellerin, L. and Magistretti, P. J., 2012. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab*. 32, 1152-1166.
- Perovic, M., Tesic, V., Mladenovic Djordjevic, A., Smiljanic, K., Loncarevic-Vasiljkovic, N., Ruzdijic, S. and Kanazir, S., 2012. BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat. *Age (Dordr)*.
- Peterson, G. L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 83, 346-356.
- Petit-Taboue, M. C., Landeau, B., Desson, J. F., Desgranges, B. and Baron, J. C., 1998. Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping. *Neuroimage*. 7, 176-184.
- Porte, D., Jr., Baskin, D. G. and Schwartz, M. W., 2005. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes*. 54, 1264-1276.
- Ramnanan, C. J., Edgerton, D. S. and Cherrington, A. D., 2012. Evidence against a physiologic role for acute changes in CNS insulin action in the rapid regulation of hepatic glucose production. *Cell Metab*. 15, 656-664.
- Reagan, L. P., 2005. Neuronal insulin signal transduction mechanisms in diabetes phenotypes. *Neurobiol Aging*. 26 Suppl 1, 56-59.
- Roger, L. J. and Fellows, R. E., 1980. Stimulation of ornithine decarboxylase activity by insulin in developing rat brain. *Endocrinology*. 106, 619-625.
- Rosenzweig, E. S. and Barnes, C. A., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol*. 69, 143-179.
- Schioth, H. B., Craft, S., Brooks, S. J., Frey, W. H., 2nd and Benedict, C., 2012. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Mol Neurobiol*. 46, 4-10.
- Schmitt, K., Grimm, A., Kazmierczak, A., Strosznajder, J. B., Gotz, J. and Eckert, A., 2012. Insights into mitochondrial dysfunction: aging, amyloid-beta, and tau-A deleterious trio. *Antioxid Redox Signal*. 16, 1456-1466.
- Schubert, M., Brazil, D. P., Burks, D. J., Kushner, J. A., Ye, J., Flint, C. L., Farhang-Fallah, J., Dikkes, P., Warot, X. M., Rio, C., Corfas, G. and White, M. F., 2003. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci*. 23, 7084-7092.
- Shetty, P. K., Galeffi, F. and Turner, D. A., 2011. Age-Induced Alterations in Hippocampal Function and Metabolism. *Aging Dis*. 2, 196-218.
- Sims, N. R. and Blass, J. P., 1986. Expression of classical mitochondrial respiratory responses in homogenates of rat forebrain. *J Neurochem*. 47, 496-505.
- Solas, M., Aisa, B., Mugueta, M. C., Del Rio, J., Tordera, R. M. and Ramirez, M. J., 2010. Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*. 35, 1664-1673.
- Song, J., Christian, K. M., Ming, G. L. and Song, H., 2012. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Dev Neurobiol*. 72, 1032-1043.
- Stoll, E. A., Cheung, W., Mikheev, A. M., Sweet, I. R., Bielas, J. H., Zhang, J., Rostomily, R. C. and Horner, P. J., 2011. Aging neural progenitor cells have decreased mitochondrial content and lower oxidative metabolism. *J Biol Chem*. 286, 38592-38601.

- Swerdlow, R. H., 2011. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1812, 1630-1639.
- Uranga, R. M., Bruce-Keller, A. J., Morrison, C. D., Fernandez-Kim, S. O., Ebenezer, P. J., Zhang, L., Dasuri, K. and Keller, J. N., 2010. Intersection between metabolic dysfunction, high fat diet consumption, and brain aging. *J Neurochem*. 114, 344-361.
- van der Heide, L. P., Ramakers, G. M. and Smidt, M. P., 2006. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol*. 79, 205-221.
- von Bohlen und Halbach, O., 2011. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 345, 1-19.
- Waldbaum, S. and Patel, M., 2010. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? *J Bioenerg Biomembr*. 42, 449-455.
- Whitwell, J. L. and Jack, C. R., Jr., 2005. Comparisons between Alzheimer disease, frontotemporal lobar degeneration, and normal aging with brain mapping. *Top Magn Reson Imaging*. 16, 409-425.
- Wyss, M. T., Jolivet, R., Buck, A., Magistretti, P. J. and Weber, B., 2011. In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *J Neurosci*. 31, 7477-7485.
- Yin, F., Boveris, A. and Cadenas, E., 2012. Mitochondrial Energy Metabolism and Redox Signaling in Brain Aging and Neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*.
- Ziv, I. and Melamed, E., 2010. Editorial: apoptosis in the aging brain. *Apoptosis*. 15, 1285-1291.