

Papel de la Angiotensina II en la resistencia a la insulina neuronal en un modelo experimental de diabetes tipo 2 en ratas

Pastorello Mariella e *Israel Anita

Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela. Email: astern88@gmail.com,

*Correspondencia: Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A, Caracas, Venezuela. E-mail: astern88@gmail.com.

Recibido: 20/05/2011

Aceptado: 20/08/2011

Resumen

La insulina es una señal clave para el estado nutricional, la cual induce respuestas centrales a través del hipotálamo. La activación del receptor de insulina en el hipotálamo (IR) reduce la ingesta de alimentos y la liberación de glucosa hepática. Se desconoce si estos mecanismos se encuentran alterados en la diabetes tipo 2 (DM2). Debido a que se conoce que el tratamiento crónico con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (IECA) o los bloqueantes de los receptores AT_1 reducen la incidencia de DM2 en individuos hipertensos, y tanto los receptores AT_1 y como los de la insulina coexisten en regiones clave para el control de balance de energía, nos hemos planteado evaluar la posible participación de la angiotensina II (ANG II) en las acciones de insulina cerebral en condiciones de diabetes. Por ello, desarrollamos un modelo animal de la DM2 con dieta alta en grasas durante 12 semanas (40% de la carga de grasa / semana). Adicionalmente, se determinaron los cambios en los niveles de glicemia en ratas tratadas intracerebroventricularmente (ICV) con ANG II, insulina o insulina II+ANG. Se emplearon ratas Sprague-Dawley (100 ± 20 g), las cuales se dividieron en dos grupos: control (dieta estándar) y DAG (dieta alta en grasas). Después de diez sema-

nas, las ratas DAG recibieron una dosis única de estrep-tozotocina (35 mg/kg, ip). En la semana 12 se evaluó la resistencia a la insulina mediante la prueba de tolerancia a la glucosa, y de inmediato las ratas fueron canuladas-ICV. Tres días después, los animales recibieron el tratamiento correspondiente y se recogió la sangre de la vena de la cola a 0 y de 2 horas. La concentración de glucosa se determinó mediante el método de glucosa oxidasa. Nuestros resultados muestran que ANG II-ICV aumenta, mientras que la insulina-ICV disminuye los niveles de glucosa periférica. Igualmente, la administración central de ANG II inhibió la reducción de la glicemia inducida por la insulina central en ratas normales. En las ratas diabéticas, el efecto de la administración de ANG II-ICV fue mayor, mientras que la acción hipoglicémica inducida por la insulina-ICV se redujo significativamente. Nuestros resultados demuestran que en este modelo de animales diabéticos hay una desregulación en la capacidad de la insulina del cerebro para modular los niveles de glucosa periférica, e indican que la ANG II parece jugar un papel importante en la resistencia neuronal a la insulina.

Palabras Clave: Insulina, angiotensina II, diabetes, dieta alta en grasa.

Abstract

Insulin is a key signal of the nutritional status, which induces central responses through the hypothalamus. The activation of the hypothalamic insulin receptor (IR) decreases food intake and hepatic glucose release. It is unknown whether these mechanisms are altered in type 2 diabetes (DM2). Since it has been reported that, chronic treatment with ACEI or ARB reduces the incidence of DM2 in hypertensive individuals, and both angiotensin II-AT₁ and IR receptors are co-localized in key regions for the control of energy balance, we were prompted to assess the possible involvement of angiotensin II (ANG II) on brain insulin actions in diabetic conditions. Thus, we developed an animal model of DM2 with high fat diet during 12 weeks (40% fat load/week). We determined the changes in glycemia levels in rats treated intracerebroventricularly (ICV) with ANG II, insulin or ANG II + insulin. Sprague-Dawley rats (100±20g) were divided into two groups: Control (standard diet) and HFD (High-fat diet). After ten weeks, HFD rats received a single dose of streptozotocin (35 mg/kg, ip). At week 12 the state of insulin resistance was assessed by the glucose tolerance test, and immediately rats were ICV-cannulated. Three days after, animals received the correspondent treatment and blood was collected from the tail vein at 0 and 2 hr. Glucose concentration was measured by glucose oxidase method. Our results show that ICV-ANG II increased while ICV-insulin decreased peripheral glucose levels. ICV-ANG II blunted the reduction of glycemia induced by central insulin in normal rats. In diabetic rats, ICV-ANG effect was increased, while ICV-insulin induced hypoglycemic action was significantly reduced. Our results demonstrate that in this diabetic animals model there is a dysregulation in the brain insulin capacity to modulate peripheral glucose levels, and they indicate that ANG II seems to play an important role in neuronal resistance to insulin.

Key Words: Insulin, angiotensin II, diabetes, High-fat diet.

Introducción

El balance energético en organismos superiores, principalmente en los mamíferos, es mantenido gracias a múltiples mecanismos que transmiten información acerca del estado nutricional del organismo, tanto en la periferia como a nivel central, para inducir las respuestas metabólicas y conductuales apropiadas para lograr la homeostasis energética (Obici y Rossetti, 2003; Seeley y Woods, 2003). Aunque las señales provenientes del intestino, estimuladas por nutrientes, son cruciales para la regulación de la conducta alimenticia momento a momento, el hipotálamo es el sitio primario donde estas

y otras señales convergen y se integran (Ahima y col., 1996). En un principio se postuló la hipótesis glucostática (Mayer y col., 1953; 1955) en la cual se afirmaba que la glucosa circulante era la principal señal del estado nutricional del organismo, ya que cambios en los niveles de esta son capaces de modular la conducta alimenticia (Kanarek y col., 1978; Walls y Koopmans 1989), pero por otro lado, se observó que también los niveles de lípidos almacenados y circulantes, generan las señales regulatorias que actúan a nivel central, dando origen a la hipótesis lipostática o adipostática (Kennedy, 1953, Mayer y col., 1955). En efecto, la evidencia sugiere que existen mecanismos homeostáticos redundantes involucrados en el mantenimiento del balance energético y por ende una sola teoría no es capaz de englobar la complejidad de este sistema regulatorio (Schwartz y Porte, 2005). Los estudios realizados hasta el momento permiten afirmar que, el hipotálamo, específicamente en el núcleo arcuato (Arc), actúa como órgano receptor, integrador y transmisor de las señales relacionadas con el estado energético del organismo desde y hacia la periferia y dentro del SNC (Schwartz y col., 2000; Friedman, 2002; Niswender y Schwartz, 2003; Flier, 2004). Se ha demostrado que, los niveles circulantes de leptina e insulina, así como de los ácidos grasos y el glicerol, modulan la función hipotalámica para generar una respuesta homeostática conductual, neuroendocrina y autonómica diseñada para mantener la adiposidad corporal (Schwartz y col., 2000). Lam y col. (2005) han propuesto que un rápido y sostenido incremento en la ingesta calórica activa concomitantemente señales anabólicas a nivel periférico, y catabólicas (regulatorias) a nivel central, encontrando que bajo condiciones de abundancia calórica prolongada se inicia un proceso de “resistencia” hipotalámica a las múltiples señales de saciedad tanto adipocíticas como nutricionales. Estas observaciones han re-direccionado el interés hacia el estudio de la participación del SNC en la génesis o progresión de los trastornos metabólicos. En efecto, la evidencia experimental demuestra que la desregulación hipotalámica participa en el desarrollo de la diabetes tipo 2 en roedores (Bruehl y col., 2007; Obici y col., 2002).

La insulina ejerce efectos metabólicos, neurotróficos, neuromoduladores y neuroendocrinos en el tejido nervioso (Barbaccia y col., 1982), jugando un papel crucial en la homeostasis energética, la reproducción, la memoria y habilidades cognitivas, puesto que alteraciones en la disponibilidad de esta hormona a nivel central contribuye con la obesidad (Kaiyala y col., 2000), diabetes, trastornos reproductivos y mentales (Craf y col., 1999; Gerozissis y col., 2001; German y col., 2011). Los niveles centrales de insulina dependen de los niveles séricos de esta, que atraviesan la barrera hematoencefálica (Margolis y col., 1967). El receptor de insulina está discretamente distribuido en el cerebro, ubicándose en el bulbo olfatorio, en el núcleo arcuato del hipotálamo, en la corteza cerebral, el cerebelo, la amígdala y el hipocampo (Havrankova y col., 1978; Van Houten, 1979;

Marks y col., 1990). Los efectos metabólicos mediados por la insulina central ocurren a nivel del núcleo arcuato, a través del cual modula la conducta alimenticia tanto a corto como a largo plazo (Schwartz y col., 1992; Sipols y col., 1995; Air y col., 2002), el flujo autonómico (Boyd y col., 1986) y la producción de glucosa hepática (Obici y col., 2002).

Se ha demostrado un papel de la insulina central, cuya administración inhibe la ingesta de alimentos e induce pérdida de peso en primates (Woods, 1979) y en roedores (Sipols y col., 1995; Gerozissis y col., 1999; Bruning y col., 2000; Air y col., 2002). Por otro lado, se ha encontrado que los animales deficientes de insulina son hiperfágicos, y esta conducta puede ser revertida luego de la administración central de insulina (Schwartz y col., 1992; Sipols y col., 1995). Basados en las similitudes entre las acciones centrales de la insulina y la leptina y la comunicación cruzada entre estas señales, los estudios más recientes sugieren que mecanismos convergentes median la respuesta neuronal a la insulina y la leptina a nivel hipotalámico, principalmente regulando la expresión de los péptidos que controlan el apetito (Schwartz y col., 1992; Sipols y col., 1995; Carvalheira y col., 2003). Así, la administración de insulina en el tercer ventrículo cerebral disminuye la expresión del NPY (péptido orexigénico) en el núcleo Arc (Schwartz y col., 1992; Sipols y col., 1995) e incrementa la de la POMC (péptido anorexigénico), mientras que el bloqueo de la PI3K con LY294002 a nivel central, promueve la inhibición de la anorexia inducida tanto por la leptina como la insulina en ratas (Niswender y Schwartz, 2003; Schwartz y col., 1997).

Las acciones centrales de la insulina, también incluyen cambios en la liberación de glucosa hepática. En efecto, Obici y col. (2002) mostraron que la infusión ICV de insulina, así como de Cpd1 (un insulino-mimético), en ratas Sprague-Dawley, no afectó la captación de glucosa por los tejidos, ni los niveles de glucagon, pero sí disminuyó la liberación de glucosa hepática (~40%), con niveles basales de insulina periférica relativamente constantes.

Si las acciones ejercidas por la insulina a nivel central son claves en el mantenimiento de la homeostasis energética, entonces las alteraciones en este sistema deben estar relacionadas con trastornos metabólicos y viceversa. En efecto, en ratones con una disrupción neuronal específica del gen que codifica para el receptor de la insulina, desarrollan obesidad sensible a la dieta, acompañada de un incremento en los niveles plasmáticos de leptina y de una ligera resistencia a la insulina. Adicionalmente, los ratones *knock-out* para el receptor de insulina, poseen un elevado porcentaje de grasa corporal y altos niveles de leptina, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia (Brüning y col., 2000). Aun más, la administración de oligodesoxinucleótidos antisentido dirigido contra la proteína precursora del receptor de insulina en el núcleo arcuato, induce hiperfagia y resistencia a la insulina en ratas (Obici y col., 2002).

La resistencia a la insulina y la hipertensión frecuentemente coexisten, y generalmente progresan a diabetes y enfermedades cardiovasculares (Ferrannini y col., 1987). Estudios clínicos prospectivos muestran que el tratamiento de pacientes hipertensos con inhibidores de la enzima convertidora (IECA) o antagonistas del receptor AT_1 , resultan en una disminución de la incidencia de nuevos pacientes diagnosticados con diabetes tipo 2 cuando se compara con otros agentes antihipertensivos (Nawano y col., 1999; Henriksen y col., 2001). Estas evidencias indican que la angiotensina II parece ser estar involucrada en el desarrollo de la DM2.

Numerosos estudios en células y modelos animales demuestran que la ANG II parece modular negativamente las acciones periféricas mediadas por la insulina a múltiples niveles de su cascada de señalización (De Gasparo y col., 2000; Fujita, 2002). Se ha observado que la infusión de ANG II induce resistencia a la insulina en ratas (Ogihara y col., 2002), y el uso de los IECA y de los bloqueantes del receptor AT_1 mejoran la sensibilidad a la insulina (Cheetham y col., 2000; Henriksen y col., 2001), entonces, la sobrereactividad del SRA, observada en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, estaría de hecho, participando en el inicio de la resistencia a la insulina en estos paciente. Por otro lado, se ha visto que el uso de los IECA y de los antagonistas del receptor AT_1 reduce el daño tisular que se observa en pacientes con DM tipo 2 (hiperplasia neointima, neuropatía), tanto en modelos animales como en pacientes (Goodfriend y col., 1996; Sowers, 2004).

Según los estudios autoradiográficos y por hibridización *in situ*, se evidencia que existen receptores de insulina y de ANG II co-localizados en el hipotálamo, específicamente en el núcleo arcuato (Marks y col., 1990; Pardini y col., 2006). Aunque las evidencias obtenidas en tejidos periféricos permiten afirmar que la ANG II interfiere con la señalización de la insulina, aun no se sabe si las acciones centrales de la ANG II pueden alterar la sensibilidad a la insulina en tejido nervioso. El estudio de la interrelación entre ambas vías, en condiciones diabéticas, aportaría información crucial sobre las posibles alteraciones en los circuitos neuronales encargados de la regulación metabólica en el desarrollo de la diabetes tipo 2.

El estudio de este trastorno metabólico, por razones éticas, es limitado en los humanos, y por ende el empleo de un apropiado modelo animal es particularmente necesario para comprender como la compleja relación entre la predisposición genética y los factores ambientales desencadenan la aparición y desarrollo de la diabetes tipo 2, y como consecuencia, optimizar las medidas farmacológicas o no, que lleven a resultados más eficaces durante su tratamiento en humanos. Sin embargo, es difícil definir el término "apropiado", ya que desde el punto de vista científico y ético, se requiere de un modelo que simule no solo el fenotipo sino también las condiciones de la patogénesis observada en humanos. Los resultados obtenidos

Material

Materiales y Métodos

con modelos en animales genéticamente predispuestos (ratones *ob/ob* o ratas Zucker *fa/fa*) o los farmacológicamente inducidos (son tioglucosa de oro, bajas dosis de ETZ o aloxano), deben ser interpretados con cuidado, ya que no estamos seguros si estos permiten responder satisfactoriamente las interrogantes planteadas, debido a su poca semejanza con el complejo proceso real (Buettner y col., 2006). A saber, en los humanos, al margen de la predisposición genética, el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 incrementa con la edad, ingesta excesiva de grasas y carbohidratos, enfermedades cardiovasculares y vida sedentaria. El uso de dietas hipercalóricas durante tiempo prolongado ha demostrado inducir en los animales un estado de resistencia a la insulina, siendo las dietas enriquecidas con grasas en roedores, llamada "dieta alta en grasa" (DAG), las que han mostrado mimetizar las alteraciones metabólicas de la DM2 con más contundencia, aceptándose como un modelo válido para el estudio de esta enfermedad (Furler y col., 1997; Lingohr y col., 2002). Varios mecanismos explican la resistencia a la insulina inducida por la DAG, el principal de ellos se relaciona con el ciclo de la glucosa-ácidos grasos (Randle y col., 1963). En efecto, los diversos estudios realizados con este modelo han mostrado que la alimentación prolongada con DAG induce incremento en el peso corporal, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, así como un aumento en número y tamaño de los adipocitos (Corbett y col., 1986; Belzung y col., 1993) y reducción de la lipólisis (Tepperman, 1986). Aun más, la evidencia experimental demuestra que la ingesta de ácidos grasos saturados por tiempo prolongado en roedores, induce una notable resistencia a la insulina (Storlien y col., 1991), siendo además más efectivas, aquellas dietas que emplean grasas de origen animal (mamíferos) o vegetal, que las grasas provenientes de aceites de pescados (Storlien y col., 1987; Rivellese y col., 2002).

Con la finalidad de simular el progreso real de esta enfermedad, se empleó la administración de bajas dosis de ETZ combinada con las dietas hipercalóricas, lo cual genera un modelo animal fenotípicamente muy similar a la diabetes tipo 2 humana. La alimentación con dieta alta en grasa induce hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, y la administración de bajas dosis de ETZ induce un moderado daño pancreáticos e hiperglicemia (Srinivasan y col., 2005). Por tal razón en el presente estudio se estandarizó y validó un modelo de diabetes tipo 2 en ratas, combinando la alimentación crónica con una dieta alta en grasa de origen porcino y el tratamiento con estreptozotocina a baja dosis. Este modelo animal se utilizó para estudiar el papel de la ANG II y sus consecuencias metabólicas, por alteraciones en la señalización de la insulina a nivel del hipotálamo.

Animales de Experimentación

Se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 100-120 g de peso corporal, procedentes del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" o del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la UCV. Los animales fueron mantenidos en un ambiente de luz controlada, con periodos alternos de 12h de luz y oscuridad, permitiéndoles libre acceso al agua y al alimento. Las ratas fueron divididas en 2 grupos experimentales: 1) Control (alimentados con dieta estándar) y 2) Diabéticos (alimentados con dieta alta en grasa). Estos últimos recibieron una dieta alta en grasa (DAG), por adición de manteca de cerdo a la dieta estándar, donde el 35% de la dieta corresponde a lípidos. Los animales alimentados con DAG, a la semana diez, fueron tratados con una dosis baja de estreptozotocina (35 mg/Kg, i.p).

Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996) y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV.

Modelo de Diabetes tipo 2

El modelo desarrollado fue una adaptación del esquema propuesto por Srinivastan (2006). Para ello, se utilizaron animales jóvenes, recién destetados, los cuales fueron sometidos a una dieta alta en grasa durante un período de doce (12) semanas. Las primeras cuatro (4) semanas los animales fueron alimentados con Ratarina® combinada con manteca de cerdo, cuyo porcentaje de lípidos total es del 35% (compuesto principalmente por colesterol y ácidos grasos saturados). Las siguientes seis (6) semanas los animales se mantuvieron con la misma alimentación, pero se complementaron con la administración, a través de una sonda intragástrica, de 3 mL de manteca de cerdo dos veces por semana, para incrementar aproximadamente a 40% la carga lipídica (calculada en función de la ingesta semanal promedio en gramos). En la semana número diez (10) los animales fueron tratados con una dosis única de estreptozotocina de 35 mg/Kg (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO).

El desarrollo de la diabetes fue monitoreado antes, durante y al finalizar el período de tratamiento a través de la determinación de la glicemia, el perfil lipídico (colesterol y triglicéridos), la cuantificación de la ingesta de alimentos y el peso corporal. Del mismo modo se evaluó la resistencia a la insulina a través de la prueba de tolerancia a la glucosa. Animales con niveles de glucosa en ayunas por encima de 200 mg/dL y con intolerancia a la glucosa, fueron considerados como diabéticos.

Química Sanguínea

Recolección de la muestra de sangre. Para el monitoreo de los animales durante el desarrollo de la diabetes, estos

fueron sometidos a 14-16 horas de ayuno previo a la recolección de la muestra de sangre de la cola del animal en tubos plásticos de 500 µL. La sangre fue centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos, y el suero obtenido en fresco se utilizó para los diferentes ensayos. Para los ensayos con tratamientos ICV, se siguió el mismo protocolo inicial, y se tomó una muestra de sangre antes (basal), a los 60, 120 y 180 min posterior al tratamiento.

Determinación de la Glucosa Sanguínea. La glucosa sanguínea se determinó por el método de glucosa oxidasa, mediante un *kit* comercial (Stanbio Laboratory®).

Determinación del Colesterol Sérico libre. Se utilizó un método enzimático usando la colesterol oxidasa, que combina la colesterol oxidasa con la colesterol estearasa, y mejorado posteriormente con el uso del reactivo de Trinder mediante un *kit* comercial (Stanbio Laboratory®).

Determinación de los triglicéridos séricos. Se realizó por el método colorimétrico mediante un *kit* comercial (Stanbio Laboratory®).

Prueba de Tolerancia a la Glucosa. Con el fin de determinar el grado de resistencia a la insulina inducido en los animales de estudio, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa al finalizar el período de inducción de la diabetes, en todos los grupos experimentales. El día del ensayo, los animales fueron restringidos del acceso al alimento la noche anterior a la recolección de la muestra. El día del experimento, los animales recibieron una dosis oral de 3 g/Kg peso corporal de glucosa. La muestra de sangre fue recolectada a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de glucosa.

Canulación Intracerebroventricular (ICV)

A los animales de experimentación se les implantó una cánula en el ventrículo lateral izquierdo bajo anestesia con pentobarbital sódico (40mg/kg, i.p.), 1 mm caudal a la sutura coronal y a 1.5 mm lateral de la sutura sagital del cráneo, mediante la ayuda de un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments). La cánula se fijó al cráneo con silicón adhesivo. Tres días después y en ayunas Pasadas 72 horas de período de recuperación postoperatorio, los animales se mantuvieron en ayuna durante 12-16h antes de recibir el tratamiento ICV con ANG II, INS o ANG+INS. La inyección ICV se realizó con una inyectora Hamilton acondicionada con un tope para asegurar la penetración de la aguja a la misma profundidad de la cánula. La validez de la canulación ICV se confirmó post-mortem, con la inyección, previo a la decapitación, de una solución de colorante (fast green, 5 µL), considerándose válidos, aquellos cuya distribución del colorante se observó en los ventrículos laterales, tercero y cuarto.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (EEM). La significancia de los resultados se determinó mediante la prueba de "t de student" y el análisis de varianza (ANOVA) de una vía,

seguido de la prueba de Bonferroni. Valores con $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

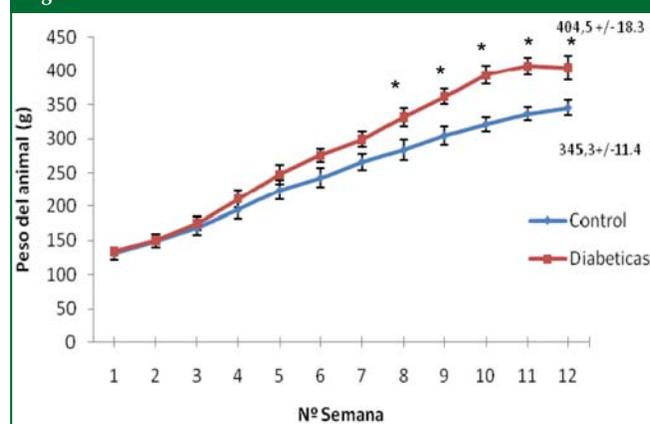
Resultados

Caracterización del modelo de diabetes tipo 2

Peso e ingesta de alimentos durante el tratamiento

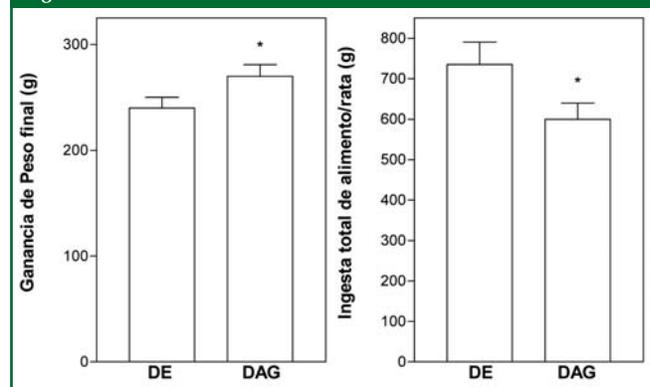
El tratamiento con una dieta estándar (control) o dieta alta en grasa (diabéticas) + estreptozotocina, produjo un aumento constante de peso corporal (Fig. 1), encontrándose que para la semana número doce, las ratas diabéticas tuvieron un peso promedio 15% superior al grupo control (Figura 2). Se observó que el alimento ingerido durante las doce semanas por la ratas DAG fue de un 16.6% menor que las alimentadas con DE, en términos de peso (Figura 2).

Figura 1



Progresión del Peso durante el tratamiento. Ratas tratadas con dieta estándar (control) y dieta alta en grasa + ETZ (diabéticas), durante 12 semanas. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

Figura 2

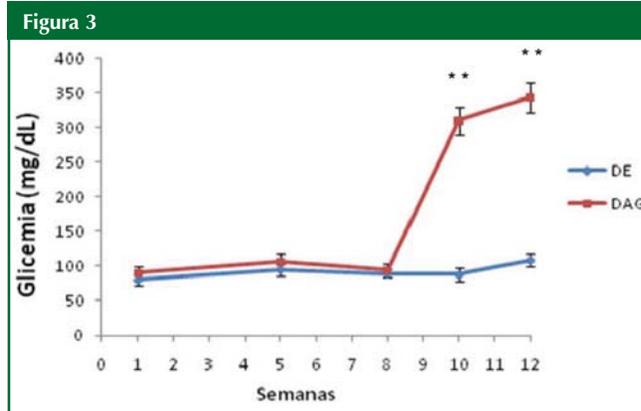


Ganancia de peso neta de los animales durante el tratamiento (Izquierda). Cantidad de alimento ingerido promedio por rata durante 12 semanas (Derecha). Dieta estándar (DE) y dieta alta en grasa (DAG). * $p < 0,05$ comparado con DE.

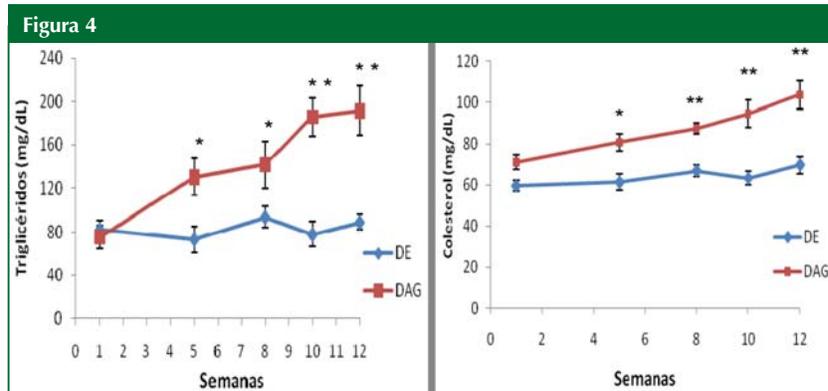
Parámetros Sanguíneos: Glicemia, triglicéridos y colesterol
Durante las primeras ocho semanas, se encontró que la glicemia en ambos grupos de animales fue similar, sin embargo luego de la administración de ETZ en la semana

número diez, el grupo de animales que recibió DAG, se hizo francamente hiperglicémico (Figura 3).

Los cambios metabólicos en los animales del grupo DAG se evidenciaron, asimismo, con alteraciones en el perfil lipídico, en los cuales se observó un incremento progresivo de la concentración de triglicéridos y colesterol en sangre, siendo significativamente superior a los animales controles (Figura 4). Estas diferencias fueron especialmente marcadas a partir de la semana número diez, luego de la administración de ETZ.



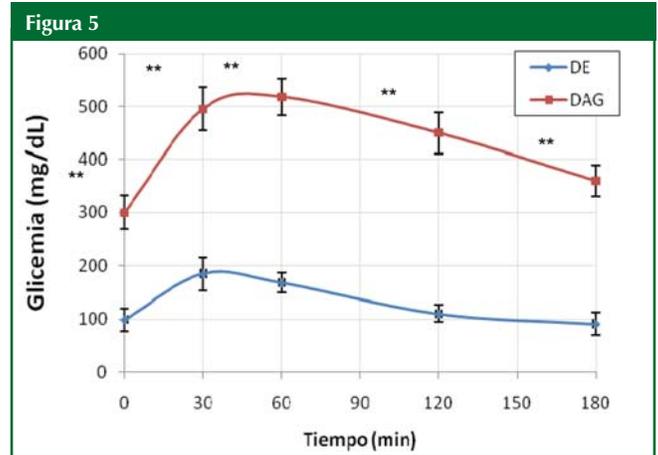
Concentración de glucosa plasmática en ayunas, desde la semana 1 a la 12, en animales con dieta estándar (DE) y dieta alta en grasa (DAG). ** p<0,01 comparado con DE.



Cambios en los niveles promedio de triglicéridos (izq) y de colesterol (der) séricos durante el tratamiento de inducción de diabetes tipo II. Dieta estándar (DE) y dieta alta en grasa (DAG). * p<0,05 y **p<0,01, comparado con DE.

Resistencia a la Insulina

Para verificar el posible estado de resistencia a la insulina, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa oral a los animales en estudio. Los resultados obtenidos muestran una clara resistencia a la insulina en los animales tratados con DAG + ETZ, los cuales sólo después de 3h de recibir la carga oral de glucosa lograron alcanzar valores de glicemia cercanos a los niveles basales, mientras que en los animales del grupo control se observó una normalización de la glicemia 2h después de recibir la misma carga de glucosa (Figura 5).



Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral realizada en la semana 12. Dieta estándar (DE) y dieta alta en grasa (DAG). ** p<0,01 comparado con DE.

Efecto de la insulina y angiotensina II central sobre los niveles de glicemia en ratas con diabetes tipo 2

Efecto de la Insulina central sobre la glicemia

Para determinar el tiempo de efecto de la insulina administrada centralmente sobre los niveles de glucosa plasmática, se monitoreó los cambios en la glicemia, antes, 30 min, 1h, 2h y 4h después de la administración de insulina ICV a ratas Sprague-Dawley adultas sanas (250-300g). Los resultados muestran una disminución

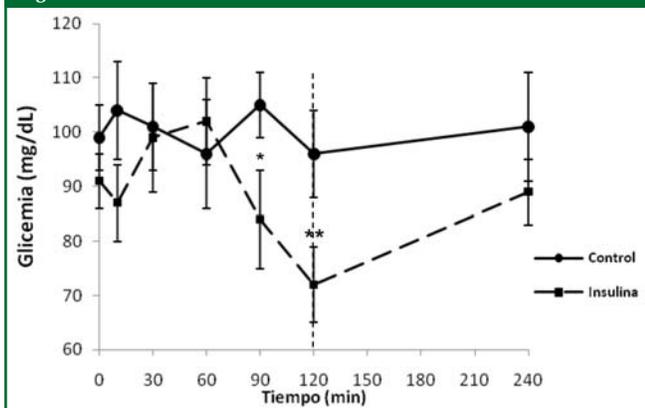
progresiva de la glicemia, que alcanza su máximo luego de 2h de la administración de la insulina central, la cual comienza a restablecerse a las 4h post-tratamiento (Figura 6).

Efecto de la Insulina y la Angiotensina II ICV sobre la glicemia en ratas diabéticas

Se determinó la concentración de glucosa en sangre de animales alimentados con dieta estándar (controles) y con DAG + ETZ (diabéticos), antes y 2 hr después de la administración ICV de insulina, angiotensina II o angiotensina II+insulina. En los animales controles, la insulina redujo los niveles de glicemia en un 20,4 +/-

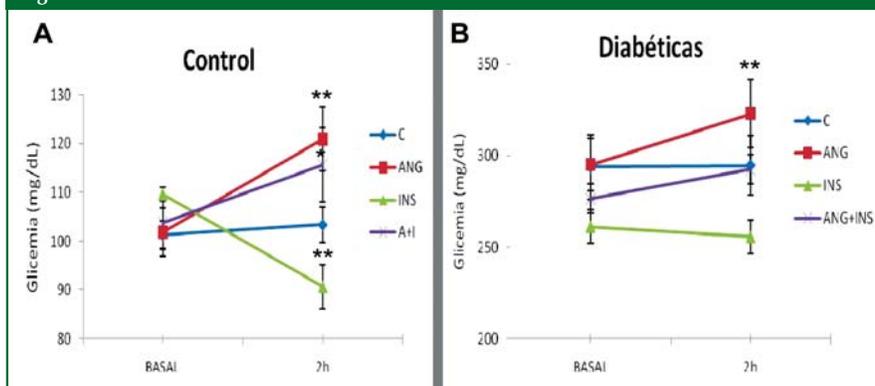
6.2%, mientras que la angiotensina II los incrementó en un 16,8 +/- 3,6%. El pre-tratamiento con angiotensina II no sólo abolió completamente el efecto hipoglicémico de la insulina, sino que incrementó en 8,5 +/- 2,3% la glicemia a las 2h (Figura 7-A y Figura 8). En los animales diabéticos, la administración de insulina no alteró los niveles de glucosa sanguínea, mientras que la angiotensina II incrementó en un 23,2 +/- 5,9%, el cual fue significativamente superior al encontrado en los animales controles. De igual forma, en los animales pretratados con ANG II y posteriormente tratados con insulina, la glicemia aumentó en un 13,5 +/- 2,8%, ligeramente superior al observado en las ratas controles (Figura 7-B y Figura 8).

Figura 6



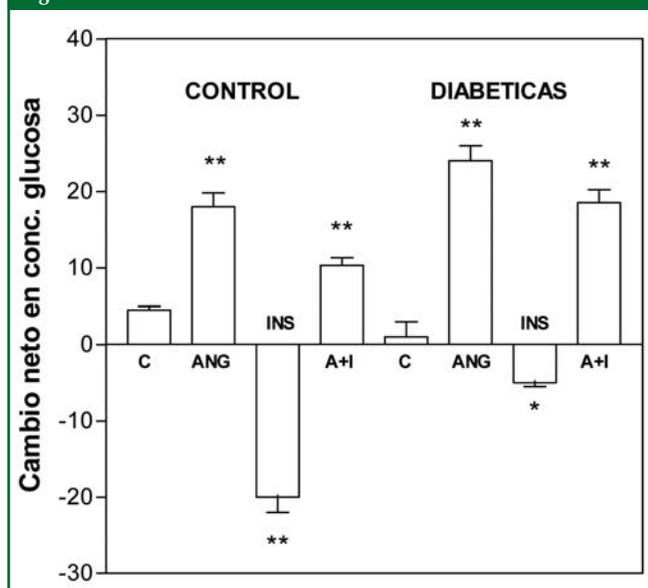
Curso temporal de los niveles de glicemia luego de la administración ICV de Insulina en ratas. *p<0,05 y **p<0,01, comparado con el control.

Figura 7



Efecto de la administración ICV de angiotensina II (ANG), insulina (INS) y angiotensina II + insulina (A+I), en ratas controles (A) y diabéticas (B). *p<0,05 y **p<0,01, comparado con su propio basal.

Figura 8



Cambio neto en la concentración de glucosa sanguínea luego de la administración ICV de solución salina (C), Angiotensina II (ANG), Insulina (INS) o Angiotensina II + Insulina (A+I) (Δ = glicemia 2h - glicemia basal). *p<0,05 y **p<0,01, comparado con su respectivo grupo control.

Discusión

La DM2 es una enfermedad compleja y multifactorial, que a pesar de la intensa investigación, aun persisten múltiples incógnitas acerca de los mecanismos patogénicos que participan en el desarrollo de esta. Entre los ámbitos de la diabetes menos abordados, se encuentra el papel del sistema nervioso central, en la génesis y progresión de la misma. Evaluar las posibles alteraciones neuroquímicas que ocurren en este proceso, hace imprescindible la utilización de modelos animales que permitan aplicar estrategias experimentales, que éticamente, serían inaceptables en humanos. La heterogeneidad de esta enfermedad se ve reflejada en la gran diversidad de modelos animales útiles para su estudio, donde la elección del modelo apropiado depende de muchos factores, bien sea que se desee reproducir el curso natural de la enfermedad en humanos o responder preguntas específicas a través de animales modificados genéticamente. Se desarrolló un modelo de DM2 inducido, que reflejara fenotípicamente las alteraciones más importantes observadas en esta enfermedad en humanos y que combina la alimentación por tiempo prolongado con una dieta alta en grasa y una baja

dosis de estreptozotocina. Se ha demostrado que las ratas Sprague-Dawley son más susceptibles a desarrollar resistencia a la insulina, cuando son alimentadas, desde temprana edad, con dietas ricas en ácidos grasos saturados, siendo la manteca de cerdo una de las grasas más ricas en este tipo de ácidos (39%). Sin embargo, a pesar de la hiperinsulinemia y dislipidemia, los animales alimentados con estas dietas, no logran desarrollar una franca hiperglicemia (Srinivasan y col., 2005). Con el objeto de desarrollar modelos análogos a la DM2 en humanos, en los que además de resistencia a la insulina, se observa una disfunción de las células β pancreáticas, se uso la ETZ a la dosis única de 35 mg/Kg. Al respecto, Srinivasan y col. (2005) encontraron que la administración de 35 mg/Kg de ETZ induce una franca hiperglicemia en animales que habían sido alimentados con DAG, más no en los que recibieron una dieta estándar. Luego de doce semanas de tratamiento, nuestros resultados muestran que las ratas alimentadas con DAG experimentaron una mayor ganancia de peso que aquellas que recibieron el alimento estándar, sin embargo, al comparar la ingesta total de alimento, se observa que el grupo alimentado con DE consumió mayor cantidad de alimento que las de DAG, en términos de peso. Sin embargo, la ingesta calórica total de los animales sometidos a DAG fue 40% superior al de los animales que consumieron el alimento estándar.

La DM2 es una enfermedad compleja y multifactorial, que a pesar de la intensa investigación, aun persisten múltiples incógnitas acerca de los mecanismos patogénicos que participan en el desarrollo de esta. Entre los ámbitos de la diabetes menos abordados, se encuentra el papel del sistema nervioso central, en la génesis y progresión de la misma. Evaluar las posibles alteraciones neuroquímicas que ocurren en este proceso, hace imprescindible la utilización de modelos animales que permitan aplicar estrategias experimentales, que éticamente, serían inaceptables en humanos. La heterogeneidad de esta enfermedad se ve reflejada en la gran diversidad de modelos animales útiles para su estudio, donde la elección del modelo apropiado depende de muchos factores, bien sea que se desee reproducir el curso natural de la enfermedad en humanos o responder preguntas específicas a través de animales modificados genéticamente. Se desarrolló un modelo de DM2 inducido, que reflejara fenotípicamente las alteraciones más importantes observadas en esta enfermedad en humanos y que combina la alimentación por tiempo prolongado con una dieta alta en grasa y una baja

Además de la ganancia de peso, la dieta alta en grasa indujo dislipidemia (en términos de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia), la cual se hizo más evidente luego de la administración de una baja dosis de ETZ, siendo esta crucial para el desarrollo de la hiperglicemia.

La prueba de tolerancia a la glucosa, demostró que una vez aplicada la carga oral de glucosa, se observa un incremento en los niveles plasmáticos de esta, los cuales tienden a volver a su nivel basal, aproximadamente 2 horas después de la carga de glucosa. En los animales de nuestro modelo se observó un rápido incremento de la glicemia, de lenta normalización, tardando 3 horas en alcanzar nuevamente sus niveles basales (pre-carga de glucosa). Lo que demuestra que los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a la glucosa en los animales DAG + ETZ se debe principalmente a una disminución en la captación de glucosa por los tejidos sensibles a la insulina, es decir, son resistentes a la insulina. En humanos, es frecuente la progresión de DM2 a síndrome metabólico, el cual cursa con resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión y obesidad. En resumen, el tratamiento aplicado en estos animales, cumple con las principales características fenotípicas de la DM2: hiperglicemia, dislipidemia, resistencia a la insulina y daño parcial en las células β -pancreáticas. Estos resultados permiten validar así, el uso de estas ratas como modelo experimental de DM2.

Los efectos biológicos mediados por la insulina a nivel central han sido considerablemente menos estudiados que sus efectos periféricos. El balance energético del organismo, depende de la acción conjunta de señales periféricas y centrales que transmiten información sobre el estado nutricional. Los trastornos metabólicos que aparecen durante el desarrollo de la diabetes alteran estas señales (Barbaccia y col., 1982; Obici y col., 2002; Seeley y Woods, 2003; Schwartz y Porte, 2005). En condiciones fisiológicas, la insulina liberada por el páncreas en respuesta al estímulo hiperglicémico, no sólo permite la captación de la glucosa a nivel periférico, sino que actúa como señal de saciedad una vez que llega al cerebro, activando circuitos neuronales que informan que el organismo está satisfecho, disminuyendo el apetito (Sipols y col., 1995; Air y col., 2002; Benoit y col., 2002; Niswender y Schwartz, 2003), e induce inhibición de la descarga del nervio vago hacia el hígado, reduciendo paulatinamente la liberación de glucosa desde el hígado hacia el torrente sanguíneo (Obici y col., 2002; Lam y col., 2005). Adicionalmente, la evidencia experimental soporta la idea que la insulina central participa en la modulación a largo plazo del balance energético, ya que una disrupción específica del gen del receptor de insulina neuronal induce un incremento de la grasa corporal (adiposidad) y de los niveles plasmáticos de insulina y leptina (Bruning y col., 2000). En condiciones de diabetes, la hiperglicemia se correlaciona con una hiperinsulinemia, situación en la que la insulina ha perdido parte de su capacidad para controlar los niveles de glucosa en

sangre. La hiperglicemia no sólo es consecuencia de la poca captación de la glucosa, sino a la liberación sostenida de esta que está almacenada en el hígado bajo la forma de glucógeno (glucogenólisis). Por ello se puede afirmar que no sólo existe resistencia a las acciones de la insulina en la periferia, sino también a las que esta ejerce centralmente.

A nivel periférico, son diversos los mediadores químicos que participan en la resistencia a la insulina, entre ellos, la angiotensina II. Este péptido, a través del receptor AT_1 , incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel intracelular, las cuales de forma directa e indirecta, e inhiben la señalización de la insulina (Folli y col., 1997; Ogiwara y col., 2002; Taniyama y col., 2005). Por otro lado, la síntesis de este péptido es sensible a los niveles de glicemia, así como la glicemia es sensible a los cambios en la concentración plasmática de la angiotensina II (Frier y col., 1984; Herings y col., 1995). De forma tal, que el sistema renina-angiotensina está íntimamente imbricado con el control de la glicemia. Sin embargo su interrelación a nivel del sistema nervioso central ha sido muy poco estudiada.

Nuestros hallazgos demuestran por primera vez, la participación de la ANG II central en el control de la glicemia y permiten inferir además, la existencia de una interrelación entre la ANG II y la insulina central, tanto en condiciones fisiológicas como diabéticas. En efecto, la administración de ANG II-ICV induce hiperglicemia en los animales controles. Este resultado podría deberse al incremento del eflujo simpático inducido por la ANG II a nivel central (Ganten y col., 1984). El incremento en el eflujo simpático central incrementa a su vez, la liberación de epinefrina y norepinefrina desde la médula de la glándula suprarrenal. La epinefrina liberada, disminuye la secreción de insulina desde el páncreas e induce un incremento de la glucogenólisis y gluconeogénesis, todas estas acciones de forma sinérgica aumentan la concentración de glucosa en la sangre (Belocopytow, 1966). Ahora bien, en los animales diabéticos se observó que el efecto hiperglicémico inducido por la ANG II central fue potenciado. Este efecto podría estar relacionado con una disfunción del sistema nervioso parasimpático, la cual frecuentemente se asocia con DM2 (Lindmark y col., 2003). Por ende, con un mecanismo contrarregulatorio parcialmente inhibido, la estimulación simpática inducida por la ANG II central, responsable de la hiperglicemia, se potenciaría.

Al evaluar el papel de la insulina central sobre la regulación de la glicemia, encontramos que la administración ICV de insulina produjo una lenta, pero importante, reducción de los niveles de glicemia en los animales controles. Esta acción estuvo significativamente atenuada en los animales diabéticos. Estos hallazgos demuestran claramente la existencia de resistencia neuronal a las acciones centrales de la insulina en la diabetes tipo 2.

La evidencia neuroanatómica de la co-localización del receptor de insulina y del receptor AT_1 de la angioten-

sina, en las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo, sugieren la posibilidad de una interacción funcional entre estos dos péptidos en la regulación central de la glicemia. Nuestros hallazgos apoyan esta posibilidad, ya que la administración ICV de ANG II inhibió el efecto hipoglicémico inducido por la insulina central, y a su vez la insulina redujo significativamente la actividad hiperglicémica de la ANG II, lo que en efecto indica la existencia de un antagonismo fisiológico a nivel del SNC. Este antagonismo podría tener su locus anatómico, por un lado en el núcleo arcuato, donde se sabe que la insulina inhibe la descarga de neuronas que proyectan hacia el tallo cerebral, y por otro, en las conexiones de las neuronas angiotensinérgicas hipotalámicas con la vía simpática que descarga hacia la periferia (Lam y col., 2005).

Alternativamente, el antagonismo entre los dos péptidos podría deberse a la interacción de las vías de señalización "aguas abajo" de los receptores de angiotensina II y de insulina, tal como se ha observado en los tejidos periféricos (Folli y col., 1997; Taniyama y col., 2005). Efectivamente, se ha demostrado que la estimulación del receptor AT₁ de la ANG II hipotalámica induce el acoplamiento y activación de la NAD(P)H oxidasa, incrementando la producción de anión superóxido y activando numerosas vías de señalización sensibles al estado redox, que incluyen la vía de las Ras-MAP kinasas (Silva y col., 2010), c-Jun N-terminal kinases (JNK) (Huang y col., 1998; Aguirre y col., 2000) y PDK-1 (Block y col., 2008). La JNK es una importante serina-treonina quinasa, capaz de inactivar al IRS-1 por fosforilación en la Ser612 causando una disociación de la subunidad p85 de la PI3K, inhibiendo la señalización de la insulina "aguas abajo" (De Fea y col., 1997). Por otro lado, la fosforilación del IRS-1 en la Ser307 por la PDK-1 (kinasa dependiente de fosfoinosítidos-1) resulta en una disociación de esta proteína del receptor de insulina y su degradación a través de proteosomas (Greene y col., 2003). De forma tal que varios mecanismos activados por la ANG II, pueden actuar sinérgicamente e inhibir la señalización de la insulina a nivel central, en animales sanos.

Ahora bien, en las ratas con DM2 el efecto antagónico entre ambos péptidos aun persiste ya que el pre-tratamiento con ANG II revierte completamente la ya disminuida capacidad hipoglicémica de la insulina-ICV, mientras que la resistencia a la insulina central la incapacita para antagonizar la acción hiperglicémica de la ANG II. Estos resultados apoyan la existencia de una disfunción en la regulación central de la glucosa mediado por la insulina y cuyo mecanismo íntimo esta por establecerse.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten demostrar, por primera vez, la existencia de "resistencia" neuronal a la insulina bajo la condición diabética, facilitada, al menos en parte, por la ANG II; y soporta la idea que la diabetes tipo 2 no sólo es un trastorno metabólico con consecuencias en el sistema nervioso, sino también un trastorno del sistema nervioso con consecuencias metabólicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su soporte técnico y la Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la UCV por su apoyo económico.

Referencias

- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, and White MF. The c-jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem* 275: 9047-9054, 2000.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382(6588):250-252, 1996.
- Air EL, Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. *Endocrinology* 143(6):2449-2452, 2002.
- Barbaccia ML, Chuang DM, Costa E. Is insulin a neuromodulator? *Adv Biochem Psychopharmacol* 33: 511-518, 1982.
- Belocipitow E. Regulation of glucose metabolism by adrenalin and the calcium ion. *Acta Physiol Lat Am* 16:42-48, 1966.
- Belzung F, Raclot T, Groscolas R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *Am J Physiol* 264(6 Pt 2):R1111-R1118, 1993.
- Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 15:22(20):9048-9052, 2002.
- Block K, Eid A, Griendling KK, Lee DY, Wittrant Y, Gorin Y. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. *J Biol Chem* 29: 283(35):24061-76, 2008.
- Boyd FT Jr, Clarke DW, Raizada MK. Insulin inhibits specific norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain. *Brain Res* 398(1):1-5, 1986.
- Bruhl H, Rueger M, Dziobek I, Sweat V, Tirsi A, Javier E, Arentoft A, Wolf OT, Convit A. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and memory impairments in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7):2439-45, 2007.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-2125, 2000.
- Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36(3):485-501, 2006.
- Carvalho JB, Ribeiro EB, Araújo EP, Guimarães RB, Telles MM, Torsoni M, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 46(12):1629-1640, 2003.
- Cheetham C, Collis J, O'Driscoll G, Stanton K, Taylor R, Green D. Losartan, an angiotensin type 1 receptor antagonist, improves endothelial function in non-insulin-dependent diabetes. *J Am Coll Cardiol* 36(5):1461-1466, 2000.
- Corbett SW, Stern JS, Keesey RE. Energy expenditure in rats with diet-induced obesity. *Am J Clin Nutr* 44(2):173-180, 1986.
- Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC. Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch Gen Psychiatry* 56(12):1135-1140, 1999.
- De Fea K, Roth RA. Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 36:12939-12947, 1997.
- De Gasparo M, Hess P, Nuesslein-Hildesheim B, Bruneval P, Clozel JP. Combination of non-hypotensive doses of valsartan and enalapril improves survival of spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1(2):151-158, 2000.
- Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med* 317(6):350-357, 1987.

- Flier, J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116, 337–350, 2004.
- Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest* 100(9):2158-2169, 1997.
- Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 60:S1-14; discussion S68-84, 85-87, 2002.
- Frier BM, Al-Dujaili EA, Corral RJ. Autonomic neural control mechanisms and the release of adrenal steroids after hypoglycaemia in man. *Horm Metab Res* 16 (suppl 1): 138–41, 1984
- Fujita T. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension* 40:872– 879, 2002.
- Furler SM, Oakes ND, Watkinson AL, Kraegen EW. A high-fat diet influences insulin-stimulated posttransport muscle glucose metabolism in rats. *Metabolism* 46(9):1101-1106, 1997.
- Ganten D, Paul M, Deboen A, Unger T, Lang RE. The brain renin angiotensin system in central cardiovascular control. *Contrib Nephrol* 43:114-128, 1984.
- German JP, Thaler JP, Wisse BE, Oh-I S, Sarraf DA, Matsen ME, Fischer JD, Tabor-sky GJ Jr, Schwartz MW, Morton GJ. Leptin activates a novel CNS mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. *Endocrinology* 152(2):394-404, 2011.
- Gerozissis K, Rouch C, Lemierre S, Nicolaidis S, Orosco M. A potential role of central insulin in learning and memory related to feeding. *Cell Mol Neurobiol* 21(4):389-401, 2001.
- Gerozissis K, Rouch C, Nicolaidis S, Orosco M. Brain insulin response to feeding in the rat is both macronutrient and area specific. *Physiol Behav* 66(1):271-275, 1999.
- Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J Med* 334:1649–1654, 1996.
- Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem* 278:8199–8211, 2003.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 27;272(5656):827-829, 1997.
- Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. Selective Angiotensin II Receptor Antagonism Reduces Insulin Resistance in Obese Zucker Rats. *Hypertension* 38:884–890, 2001.
- Herings RMC, de Boer A, Stricker BHC, Leufkens HGM, and Porsius A. Hypoglycaemia associated with use of inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Lancet* 345: 1195–1198, 1995.
- Huang XC, Deng T, Sumners C. Angiotensin II stimulates activation of Fos-regulating kinase and c-Jun NH2-terminal kinase in neuronal cultures from rat brain. *Endocrinology* 139(1):245-251, 1998.
- Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Schwartz MW. Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes* 49(9):1525-1533, 2000.
- Kanarek RB, Mayer J. 2-Deoxy-D-glucose induced feeding: relation to diet palatability. *Pharmacol Biochem Behav* 8(5):615-617, 1978.
- Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140(901):578-596, 1953.
- Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Pocai A, Rossetti L. Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science*. 309(5736):943-947, 2005.
- Lindmark S, Wiklund U, Bjerle P y Eriksson JW. Does the autonomic nervous system play a role in the development of insulin resistance? A study on heart rate variability in first-degree relatives of Type 2 diabetes patients and control subjects. *Diabet Med* 20, 399-405, 2003.
- Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival-a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol Med* 8(8):375-384, 2002.
- Margolis RU, Altszuler N. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature*. 215(5108):1375-1376, 1967.
- Marks JL, Porte D Jr, Stahl WL, Baskin DG. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127(6):3234-3236, 1990.
- Mayer J. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N Engl J Med* 249(1):13-16, 1953.
- Mayer J. Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann NY Acad Sci* 63(1):15-43, 1955.
- Nawano M, Anai M, Funaki M, Kobayashi H, Kanda A, Fukushima Y, Inukai K, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y, Asano T. Imidapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, improves insulin sensitivity by enhancing signal transduction via insulin receptor substrate proteins and improving vascular resistance in the Zucker fatty rat. *Metabolism* 48(10):1248-55, 1999.
- Niswender KD, Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol* 24(1):1-10, 2003.
- Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 5(6):566-72, 2002.
- Obici S, Rossetti L. Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology*. 144(12):5172-8, 2003.
- Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8(12):1376-82, 2002.
- Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Katagiri H, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Komuro I, Fujita T. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension* 40:872– 879, 2002.
- Pardini AW, Nguyen HT, Figlewicz DP, Baskin DG, Williams DL, Kim F, Schwartz MW. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res* 1112(1):169-178, 2006.
- Randle PJ. Control of insulin secretion in health and disease. *Isr Med J* 22:408-19, 1963.
- Rivellese AA, De Natale C, Lilli S. Type of dietary fat and insulin resistance. *Ann NY Acad Sci* 967:329-35, 2002.
- Silva J, Pastorello M, Arzola J, Zavala LE, De Jesús S, Varela M, Matos MG, del Rosario Garrido M, Israel A. AT receptor and NAD(P)H oxidase mediate angiotensin II-stimulated antioxidant enzymes and mitogen-activated protein kinase activity in the rat hypothalamus. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11(4):234-42, 2010.
- Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44(2):147-51, 1995.
- Schwartz MW, Porte D Jr. Diabetes, Obesity, And The Brain. *Science* 307 (21): 375-379, 2005.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46(12):2119-23, 1997.
- Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130(6):3608-16, 1992.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661–671, 2000.
- Seeley RJ, Woods SC. Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nat Rev Neurosci* 4(11):901-909, 2003.
- Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1597–H1602, 2004.
- Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 52(4):313-20, 2005.
- Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* 21: 237(4817):885-888, 1987.
- Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 40(2):280-289, 1991.
- Taniyama Y, Hitomi H, Shah A, Alexander RW, Griendling KK. Mechanisms of reactive oxygen species-dependent downregulation of insulin receptor substrate-1 by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6):1142-1147, 2005.
- Tepperman HM, Dewitt J, Tepperman J. Effect of a high fat diet on rat adipocyte lipolysis: responses to epinephrine, forskolin, methylisobutylxanthine, dibutyryl cyclic AMP, insulin and nicotinic acid. *J Nutr* 16(10):1984-1991, 1986.
- Van Houten M, Posner BI, Kopriwa BM, Brawer JR. Insulin-binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology* 105(3):666-73, 1979.
- Walls EK, Koopmans HS. Effect of intravenous nutrient infusions on food intake in rats. *Physiol Behav* 45(6):1223-1226, 1989.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282(5738):503-5, 1979.