



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**“Efecto de los antioxidantes sobre la expresión de moléculas  
que regulan la conducta alimentaria en ratas diabéticas”**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

**M. en C. Martha Isela Barragán Bonilla**

DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Mónica Espinoza Rojo**

CODIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Mónica Ramírez Ruano**



**Chilpancingo, Guerrero, julio 2019**




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

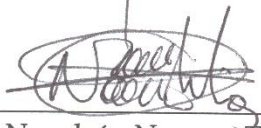
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 14 días del mes de junio del dos mil diecinueve, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de los antioxidantes sobre la expresión de moléculas que regulan la conducta alimentaria en ratas diabéticas", presentada por la alumna Martha Isela Barragán Bonilla, para obtener el Grado de Doctora en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

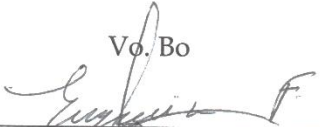
  
Dra. Mónica Espinoza Rojo  
Dirección de tesis

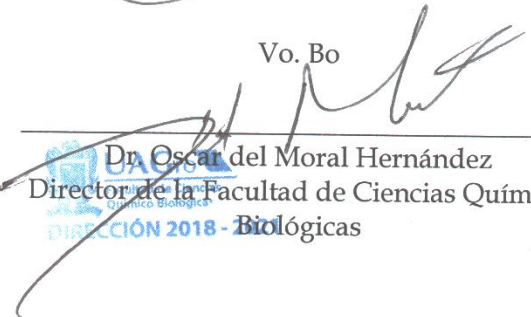
  
Dra. Isela Parra Rojas

  
Dr. Alejandro Millán Vega

  
Dr. Napoleón Navarro Tito

  
Dra. Penélope Aguilera Hernández

Vo. Bo  
  
Dra. Eugenia Flores Alfaro  
Coordinadora del Doctorado en Ciencias Biomédicas

Vo. Bo  
  
Dr. Oscar del Moral Hernández  
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo, Guerrero; en colaboración con el Laboratorio Número 13 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigaciones Avanzadas (CINVESTAV), Sede Sur en la Ciudad de México.

Bajo la dirección de la  
**Dra. Mónica Espinoza Rojo**

La codirección de la  
**Dra. Mónica Ramírez Ruano**

La asesoría externa de  
**Dra. Penélope Aguilera Hernández**  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN)  
"Manuel Velasco Suárez"

La asesoría de  
**Dra. Isela Parra Rojas**  
**Dr. Napoleón Navarro Tito**  
**Dr. Alejandro Millán Vega**

Esta investigación se realizó empleando equipamiento de proyectos de infraestructura de la Dra. Mónica Espinoza Rojo y Dra. Mónica Ramírez Ruano financiados por CONACyT (Clave de proyectos: 269889 y 269696, respectivamente).

Así mismo, durante el periodo en que la C. Martha Isela Barragán Bonilla cursó el Doctorado en Ciencias Biomédicas, recibió beca de CONACyT con número de becario: 429417.



## AGRADECIMIENTOS

*A lo largo de esta etapa, ha habido una gran cantidad de personas que me han acompañado en algún punto de este camino y a las que quisiera agradecer aunque el espacio sea pequeño:*

*A la Dra. Mónica Espinoza Rojo, quien me ha guiado durante tanto tiempo en muchos aspectos de la vida. Gracias a ella tuve mi primer acercamiento con la ciencia; y desde entonces, su asesoramiento y compañía han sido importantes para mi desarrollo profesional y humano.*

*A Moni Ramírez, por aceptarme como estudiante y confiar en mis capacidades. Por siempre procurar mi formación profesional y social. Es una de las mujeres a las que admiro y aprecio demasiado. Gracias por motivarme siempre y por tu amistad.*

*Gracias a ambas por su confianza, por apoyar mi participación en actividades extracurriculares relacionadas a la difusión de la ciencia y educación. Les agradezco enormemente ser parte de estos proyectos que son importantes para la sociedad. Cuando me preguntan si he conocido a mujeres que me inspirado a continuar mi preparación profesional, siempre hablo de las dos.*

*A mis sinodales: Dra. Penélope Aguilera Hernández, Dra. Isela Parra Rojas, Dr. Napoleón Navarro Tito y Dr. Alejandro Millán Vega, y al Dr. Eduardo Castañeda Saucedo por cada una de sus aportaciones para el desarrollo de este trabajo.*

*A todos los integrantes del laboratorio de Biología Molecular y Genómica, por mostrarme tantas veces que se puede trabajar en equipo. De manera especial, a Migue, con quien he recorrido esta trayectoria académica desde que ingresé al laboratorio. ¡Migue! ¿Cómo le haces para saber todo?. También a los que forman parte del laboratorio de Proteómica y Genómica Funcional. Gracias a ambos grupos de trabajo por su cariño y su apoyo en la organización de la primera “semana del cerebro” en Chilpancingo. Su alegría, disposición y responsabilidad fueron imprescindibles.*

*A mis amigos: Los V.I.P.: Toño, César, Barrera y Dra. Moni. A “Los Coyotes” (DJM<sup>3</sup>), por su compañía en momentos conflictivos ja, ja, ja. A Kaika y Alex, a Tania y Christian, a Jose, a Elena e historiadores, a Hugo y Karen.*

*A Gerardo y familia, por su apoyo en cada momento y su cariño.*

*Al mejor equipo de cátedras que podría conocer: Dra. Paty, Dr. Richard y Moni. Admiro mucho su profesionalismo, su manera de apoyar a sus estudiantes. Aprecio mucho su amistad.*

*A integrantes del Departamento de Farmacobiología: Dra. Mónica Lamas, Dra. Gisela Gómez, Dra. Ileri y a la M. en C. Itzel, por sus asesorías en cada ocasión que asistí al laboratorio.*

*A Clubes de Ciencia México, de manera particular a Gabriel Fuentes, mi compañero de club desde el comienzo. Por mostrarme que no existen fronteras para desarrollar un trabajo en conjunto. A nuestros estudiantes en Guanajuato y Mérida por todo su cariño e interés que mostraron en nuestro trabajo. Su amistad es muy valiosa y las personas que he conocido a través de ese programa, tienen un fin común compartido. #SoyClubera*

*A Ciencia en Guerrero, jóvenes guerrerenses preocupados por la educación en el estado.*

*A Pao, por su paciencia y apoyo.*

*Me siento una persona demasiado afortunada de conocerlos y de haber compartido algún momento de nuestras vidas.*



## **DEDICATORIA**

*A mi familia,  
quienes me han apoyado en todo momento  
y siempre han aceptado mis decisiones.  
Por estar siempre y ser mi soporte.*

*Mamá  
Papá  
Freddy y familia  
Laura y familia  
Juan Carlos  
Luis Alberto*

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
<i>Diabetes mellitus</i> .....	3
<i>Regulación de la conducta alimentaria: Hipotálamo como centro</i> .....	
----- <i>integrador de señales que regulan el apetito</i> .....	3
• Moléculas centrales y periféricas que regulan el apetito en hipotálamo ----	4
• Cambios en el nivel de expresión de moléculas reguladoras del apetito en DM .....	7
<i>Estrés oxidante en la patofisiología de la DM</i> .....	8
• Especies reactivas del oxígeno como moléculas reguladoras del apetito ---	10
<i>Fármacos empleados en el tratamiento de la DM</i> .....	12
• Metformina .....	12
• Nutraceúticos en el tratamiento de la DM .....	12
<b>CAPÍTULO I.</b>	
“Combined administration of streptozotocin and sucrose accelerates the appearance of type 2 diabetes symptoms in rats” .....	14
<b>CAPÍTULO II.</b>	
“Efecto de los antioxidantes sobre la expresión de moléculas que regulan la conducta alimentaria en ratas diabéticas” .....	27
<b>Discusión general</b> .....	54
<b>Conclusiones</b> .....	65
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	66
<b>Anexo.</b> Oficio: CICUAL/SO/VI/22617/028/2017 .....	76

## RESUMEN

**Introducción.** La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad con una prevalencia mundial elevada. Los modelos animales son de enorme utilidad para entender la enfermedad y buscar de estrategias terapéuticas novedosas que eviten o atenúen las complicaciones que se presentan en la enfermedad. La hiperfagia diabética es una conducta que impide un manejo adecuado del paciente diabético, el control de esta conducta, podría ser reflejo de la mejoría del paciente.

**Objetivo.** Establecer un modelo de diabetes representativo que posea la mayoría de las características de la enfermedad; y evaluar si los antioxidantes pueden regular la hiperfagia diabética y determinar si tiene relación con el cambio en la expresión de moléculas que regulan el apetito.

**Materiales y métodos.** Para obtener el modelo de DM, ratas Wistar de 2 días de edad, machos y hembras, recibieron estreptozotocina (STZ; 70 mg o 90 mg/kg) vía i.p. Los grupos de ratas con 70 mg/kg de STZ, tuvieron acceso a agua azucarada al 10 o 30 % durante 7 u 11 semanas. Para evaluar el efecto de los antioxidantes, se aplicaron los siguientes tratamientos: metformina (Met; 100 mg/kg), extracto de ajo envejecido (EAE; 200 mg/kg), resveratrol (Rsv; 2.25 mg/kg); y curcumina (Cur; 50 mg/kg) fueron dados por vía oral durante 28 días en edad adulta\*; y se incluyó un grupo con alimentación controlada (PF, pair feed). Se midió la glicemia, tolerancia a la insulina, concentración de insulina y leptina por ELISA en plasma. Se evaluó la expresión de neuropéptidos NPY y POMC en hipotálamo por inmunofluorescencia, y se cuantificaron los marcadores de estrés oxidante como glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S transferasa (GST), malondialdehído (MDA) y grupos carbonilo en plasma.

**Resultados.** Se generó un modelo de DM en ratas macho a los que se les administró 70 mg de STZ/kg y se les proporcionó agua azucarada al 10 % durante 7 semanas. Estos animales presentaron hiperglucemia en ayuno, hiperfagia, poca ganancia de peso corporal, resistencia moderada a la insulina, bajos niveles de insulina, estrés oxidante, aumento en la expresión de NPY y disminución de POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo. En este modelo de DM se evaluó el efecto de los tratamientos con antioxidantes. Los tratamientos con Met y EAE indujeron actividad antihiperglucemiante, mientras que el Rsv, Cur y PF generaron efecto hipoglucemiante. La Cur atenuó el estrés oxidante. Ningún tratamiento disminuyó la hiperfagia diabética; sin embargo, el EAE y la Cur disminuyeron la expresión de NPY.

**Conclusión.** El modelo más apropiado para estudiar la DM fue el grupo de ratas macho a las que se les administró 70 mg de STZ/kg e ingirieron agua azucarada al 10 % durante 7 semanas, ya que presentaron la mayoría de las características de la DM. Los antioxidantes pueden controlar la glicemia, sin embargo, sólo la Cur y el EAE pueden regular la expresión de NPY sin afectar la conducta hiperfágica.

## ABSTRACT

**Introduction.** Diabetes mellitus (DM) is a disease with a very high prevalence worldwide. Animal models are very useful to understand the disease and to search for new therapeutic strategies that avoid or attenuate the complications that occur in this disease. Diabetic hyperphagia is a behavior related to inadequate control of the diabetic patient, therefore its control, could reflect the improvement of the diabetic individual.

**Objective.** To establish a representative DM model that present most of the characteristics of the disease; and to evaluate if antioxidants can regulate diabetic hyperphagia and determine if this is related to the change in the expression of molecules that regulate appetite.

**Materials and methods.** Male and female Wistar rats of 2-days-old, received streptozotocin (STZ, 70 mg or 90 mg/kg) i.p. Groups of rats with 70 mg/kg of STZ, were given a sucrose-sweetened beverage (SSB; sucrose at 10 or 30 %) during 7 or 11 weeks. The treatments: metformin (Met, 100 mg/kg), aged garlic extract (EAE, 200 mg/kg), resveratrol (Rsv, 2.25 mg/kg); and curcumin (Cur, 50 mg/kg) were given orally for 28 days in adulthood of the rats \*, and we included a controlled feeding group (PF). The glycaemia, insulin tolerance, insulin and leptin concentration were measured by ELISA in plasma; expression of NPY and POMC neuropeptides in the hypothalamus were measured by immunofluorescence; oxidative stress markers such as glutathione peroxidase activity (GPx) and glutathione S transferase (GST), in addition of malondialdehyde (MDA) and carbonyl groups were determined in plasma.

**Results.** A diabetes model was generated in male rats with 70 mg of STZ/kg and SSB 10 % for 7 weeks. They showed fasting hyperglycemia. hyperphagia, poor body weight gain, moderate insulin resistance, low insulin levels, moderate oxidative stress, increased expression of NPY and decreased of POMC in the arcuate nucleus of the hypothalamus. In this model of DM, the effect of the antioxidant treatments was evaluated. The Met and EAE showed antihyperglycemic activity; Rsv, Cur and PF had hypoglycemic effect. The Cur attenuated the oxidative stress. Any treatment decreased the diabetic hyperphagia, however, EAE and Cur promoted the decrease of NPY expression.

**Conclusion.** The most appropriate model to study DM was the group of male rats that were given 70 mg of STZ/kg and SSB 10 % for 7 weeks because they presented most of the characteristics of DM. Antioxidants can control glycaemia, however, only Cur and EAE can regulate the expression of NPY without affect the hyperphagic behavior.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que representa un problema mundial de salud pública. En el año 2017 se calculó que 425 millones de personas adultas tenían DM, y se prevé que esta cifra aumente a 629 millones para el año 2045 (American Diabetes Association, ADA, 2017; International Diabetes Federation, IDF, 2017). Esta condición es multifactorial y degenerativa, en la que se presenta hiperglucemia crónica, causada por deficiencia parcial o total en la secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas, o bien por defectos en su acción sobre sus tejidos blanco (resistencia a la insulina) (ADA, 2017; IDF, 2017).

Los síntomas característicos de la enfermedad son fatiga, visión borrosa, sed abundante (polidipsia), micción frecuente (poliuria), y hambre constante (hiperfagia). Ésta última, es una conducta que surge como un mecanismo de compensación ante la carencia de glucosa en tejidos sensibles a insulina; es decir, la hiperfagia es resultado del desequilibrio en la homeostasis energética. En efecto, la conducta alimentaria es modulada como parte del mecanismo de regulación sobre la disponibilidad y homeostasis de nutrientes como la glucosa (Parker y Bloom, 2012). Por lo tanto, su control podría reflejar la mejoría de un paciente diabético.

### **Regulación de la conducta alimentaria: el hipotálamo como centro integrador de señales que regulan el apetito**

La conducta alimentaria es un proceso en el que participan señales orexigénicas (inducen el apetito) y anorexigénicas (inhiben el apetito) (Valassi *et al.*, 2008), que provienen del sistema nervioso central (SNC) y de órganos periféricos como el estómago, tejido adiposo y páncreas. Éstos interactúan entre sí para modular la respuesta a la ingesta de nutrientes y mantener la homeostasis energética del organismo de acuerdo a las necesidades del mismo (Grayson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Mergenthaler *et al.*, 2013; Wilson y Enriori, 2015).

El centro regulador de la conducta alimentaria en el SNC, es el hipotálamo, el cual se localiza alrededor del tercer ventrículo (3V), abajo del tálamo y encima de la eminencia media cerebral (ME, *media eminence*), uno de los órganos circunventriculares en los que la barrera hematoencefálica (BBB, *Blood Brain Barrier*) está ligeramente modificada con capilares semipermeables que permiten el intercambio selectivo entre moléculas del flujo sanguíneo y cerebroespinal con las neuronas del hipotálamo (Harriette, 2014). Esta región se divide en diversos núcleos, entre los que destacan el núcleo arcuato (ARC), paraventricular (PVN), ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH) y área lateral (LH) (Arora y Anubhuti, 2006; Parker y Bloom, 2012; Williams 2001), y constantemente recibe información sobre el estado nutricional y energético del organismo desde la periferia; esto le permite controlar la homeostasis de la glucosa y el peso corporal (Parker y Bloom, 2012; Wilson y Enriori, 2015).

El ARC es considerado el núcleo principal para el control del apetito, su localización cercana a la ME, le permite tener la posición ideal para recibir señales provenientes de la periferia e integrarlas y de este modo, mantener la homeostasis energética (Rodríguez *et al.*, 2010). Las neuronas de este núcleo constituyen a las “neuronas de primer orden”, y tienen proyecciones recíprocas con otros núcleos hipotalámicos, donde se localizan las “neuronas de segundo orden”, entre éstos, se incluyen los núcleos PVN, DMH, VMH y LH (Gehlert, 2004; Malva *et al.*, 2012; Schwartz *et al.*, 2000).

### **Moléculas centrales y periféricas que regulan el apetito y saciedad en hipotálamo**

El ARC contiene dos grupos de neuronas especializadas e interconectadas y funcionalmente distintas con respecto a la inducción del apetito y saciedad debido a que expresan diferentes neuropéptidos. Se encuentran neuronas que coexpresan al precursor de melanocortinas, proopiomelanocortina (POMC) y al transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART) (neuronas<sup>POMC/CART</sup>), ambos neuropéptidos con acción anorexigénica; también se localizan las neuronas que coexpresan al neuropéptido Y (NPY) y proteína relacionada a Agouti (AgRP) (neuronas<sup>NPY/AgRP</sup>), con efectos orexigénicos (Chang *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 1998; Kohno *et al.*, 2012).

POMC, CART, NPY y AgRP son los principales neuropéptidos que promueven saciedad o apetito. Su expresión y secreción es inducida principalmente por señales que se producen fuera del SNC. En su mayoría son hormonas peptídicas como la insulina y la leptina que tienen efectos anorexigénicos y la grelina con actividad orexigénica (Kim *et al.*, 2014).

La insulina es una hormona secretada por el páncreas, la unión de insulina a sus receptores (IR) en las neuronas del ARC, inicia cascadas de señalización que activan la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa/proteína cinasa B (PI3K/Akt), estimula la actividad neuronal de las neuronas<sup>POMC/CART</sup> e inhibe la actividad de las neuronas<sup>NPY/AgRP</sup> (Belgardt y Brüning, 2010; Niswender *et al.*, 2005; Schmidt y Hickey, 2009; Schwartz 2000).

La leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo, cuando se une a sus receptores (LepR), activa la vía de la Janus Cinasa y el Transductor de Señales y Activador de la Transcripción (JAK-STAT) y PI3K/Akt y regula positivamente la transcripción de POMC en neuronas<sup>POMC/CART</sup> (Belgardt y Brüning, 2010; Morrison *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2007).

Por otra parte, la grelina, hormona secretada en estómago, es un ligando para el receptor 1 secretagogo de la hormona del crecimiento (GHSR1, *Growth hormone secretagogue receptor*), un receptor acoplado a proteínas G. Su cascada de señalización estimula la actividad de la fosfolipasa C, aumenta los niveles de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) y Ca<sup>2+</sup> intracelulares (Kojima y Kangawa, 2005), estimulando factores de transcripción esenciales para la expresión de NPY y AgRP y promoviendo el apetito (Chen *et al.*, 2004; Diéguez *et al.*, 2011; Kamegai *et al.*, 2001; Shintani *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002).

Los neuropéptidos secretados por neuronas del ARC, actúan sobre neuronas de segundo orden que se encuentran ubicadas en otros núcleos hipotalámicos. NPY ejerce su efecto orexigénico a través de la estimulación de 2 receptores (Y<sub>1</sub> y Y<sub>5</sub>), que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> mediando la inhibición de adenilato ciclasa, descenso en los niveles de adenosin monosfosfato

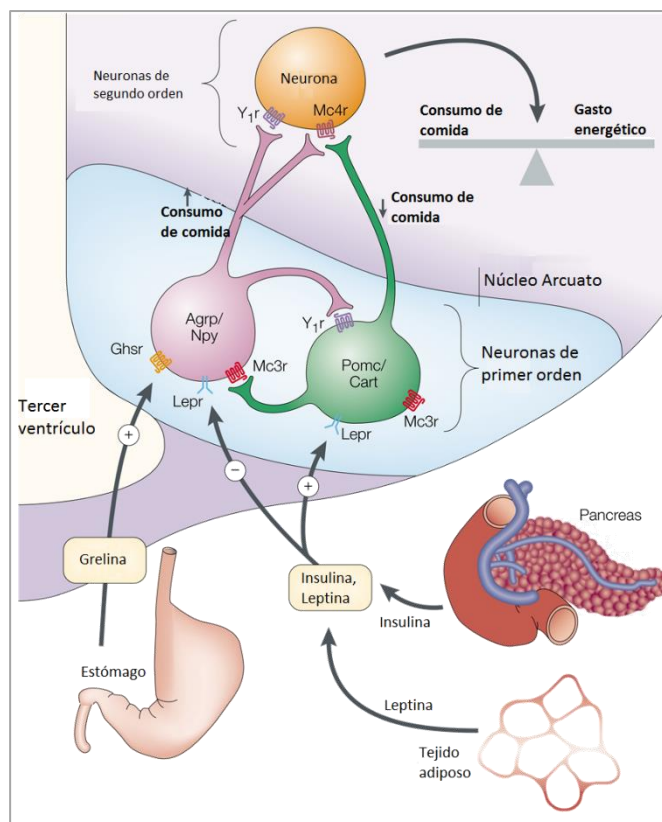


cíclico (AMPC) (Gericke *et al.*, 2009; Arora y Anubhuti, 2006), y la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Gehlert, 2004; Malva *et al.*, 2012).

POMC es un neuropéptido precursor de la hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH) que ejerce efectos orexigénicos mediante la unión a sus receptores MC3R y MC4R (Williams *et al.* 2001; Belgardt y Brüning, 2010; Schwartz *et al.*, 2000). AgRP es un péptido que actúa como un antagonista para los receptores de melanocortinas MC3R y MC4R bloqueando la unión de  $\alpha$ -MSH a sus receptores (Kim *et al.*, 2000; Schwartz *et al.*, 1997).

CART es un péptido escasamente estudiado y no se tiene información extensa sobre sus receptores y de la vía de señalización que induce. Sin embargo, cuando es administrado vía ICV (intracerebroventricular) es asociado con la estimulación de Fos en neuronas del PVN, ARC y DMN (Maletínská *et al.*, 2007; Nagelová *et al.*, 2014; Vrang *et al.*, 1999). Investigaciones recientes han demostrado que CART ejerce un efecto anorexigénico u orexigénico dependiendo de su localización en los núcleos específicos del hipotálamo. En ARC y PVN es capaz de inhibir el apetito, mientras que en DMH y LH induce el consumo de alimentos (Hou, *et al.*, 2010; Nagelová *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2008).

Bajo condiciones fisiológicas normales después de consumir alimentos, tanto las concentraciones altas de glucosa y ácidos grasos como la insulina y la leptina, que son secretadas en proporción a los nutrientes antes mencionados, actúan como agentes anorexigénicos. La unión de estas hormonas a sus receptores en el ARC, inducen el incremento en la expresión de los neuropéptidos POMC y CART y disminución de los neuropéptidos NPY y AgRP generando saciedad. Mientras que en periodos de ayuno, los nutrientes disponibles son bajos, así como los niveles de insulina y leptina, en tanto que los niveles de grelina (secretadas por el estómago) aumentan; tales señales inducen el incremento del NPY y AgRP y la disminución de POMC y CART generando apetito (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de la regulación central y periférica de la conducta alimentaria. (Modificado de Barsh y Schwartz, 2002)

### **Cambios en el nivel de expresión de moléculas reguladoras del apetito en DM**

En modelos experimentales de DM inducidos con STZ, se ha evidenciado que las neuronas<sup>NPY/AgRP</sup> se encuentran más activas, mientras que las neuronas<sup>POMC/CART</sup> están menos activas; en parte, debido a la deficiencia de insulina y leptina y al incremento del nivel de grelina circulante (Dong *et al.*, 2006; German *et al.*, 2010; Havel *et al.*, 1998; Ishii *et al.*, 2002; Leedom y Meehan, 1989; Mao *et al.*, 2002; Obici *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2000; Sindelar *et al.*, 1999; Sipols *et al.*, 1995; Woods *et al.*, 1979). En el hipotálamo, el nivel de expresión de NPY y AgRP se encuentran aumentados (Fu *et al.*, 2002; Sindelar *et al.*, 2002; Barragán-Bonilla, 2015), mientras que POMC y CART disminuyen (Kim *et al.*, 1999; Havel *et al.*, 2000). Todos estos cambios contribuyen de manera importante para la persistencia de la hiperfagia diabética.

## **Estrés oxidante en la fisiopatología de la DM**

Durante la DM se desarrollan complicaciones a largo plazo, acelerándose en pacientes que no reciben el tratamiento oportuno y/o adecuado o que no evitan algunos factores de riesgo, como la ingesta alta de carbohidratos, lo cual impide su control glicémico (ADA, 2017; IDF, 2017).

Durante el metabolismo de la glucosa, normalmente se forman especies reactivas de oxígeno (EROs) en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa. Este proceso ocurre en la cadena transportadora de electrones (CTE), que está conformada de 5 complejos enzimáticos (I, II, III, IV y V) localizados en la membrana interna de las mitocondrias. NADH y FADH<sub>2</sub> (generados en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos-TCA) ingresan a la CTE y transfieren sus electrones en los diferentes complejos hasta el último aceptor, el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), reduciéndolo a H<sub>2</sub>O. Sin embargo, del 1 – 4 % es reducido parcialmente a anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>); éste, bajo la acción de la superóxido dismutasa (SOD) es convertido a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y posteriormente a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> por la glutatión peroxidasa (GPx) en mitocondria o por la catalasa (CAT) en peroxisomas. Por lo tanto, durante un estado hiperglicémico, existe glucosa disponible para que ocurra una mayor entrada de glucosa hacia la célula, lo que se exacerba la producción de EROs que sobrepasa la capacidad del sistema de defensa antioxidante, condición conocida como “estrés oxidante” (Gutowski y Kowalczyk, 2013; Nelson, 2005).

En los tejidos que constantemente internalizan glucosa (páncreas, retina, riñón y cerebro) por tener moléculas transportadoras (GLUT) en la membrana de las células que no dependen de insulina, el establecimiento del estrés oxidante compromete de manera importante la viabilidad celular (Niedowicz y Daleke, 2005).

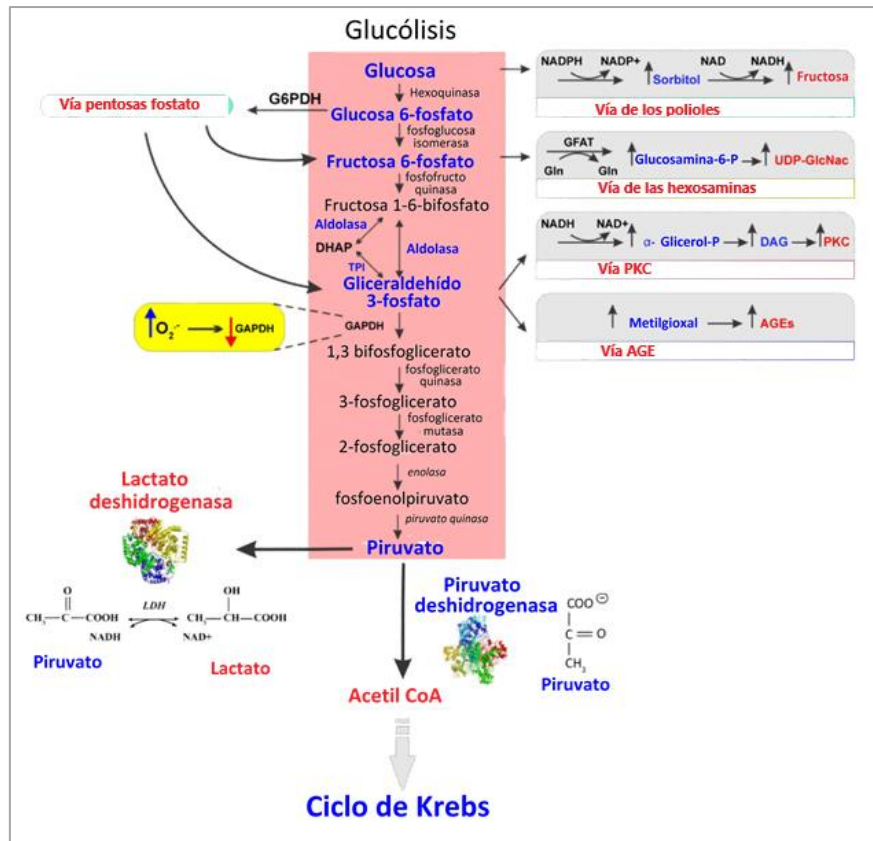
El exceso de glucosa intracelular conlleva al aumento de la actividad de otras rutas metabólicas como la vía de los polioles. En esta vía, la enzima aldosa reductasa convierte glucosa a sorbitol, utilizando como cofactor a NADPH, requerido para la regeneración del antioxidante GSH. Debido a la baja afinidad de la aldosa reductasa por la glucosa, sólo en condiciones de hiperglicemia está activa y promueve la

disminución de GSH reducido; de esta manera, provoca que las defensas antioxidantes se reduzcan, favoreciendo de este modo la disminución de la capacidad para amortiguar la producción de EROs (Prasad *et al.*, 2014).

Aunado a lo anterior, se sabe que el  $O_2^{\cdot-}$  suprime la actividad de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), esto promueve a que el metabolismo de la glucosa sea desviado a otras vías: la glucosa-6-fosfato entra a la vía de las pentosas; la fructosa-6-fosfato entra a la vía de las hexosaminas; el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) puede ser convertido a diacilglicerol (DAG) y éste activar a la proteína cinasa C (PKC); o bien, el G3P es convertido a metilglioxal, un precursor de la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), los cuales se unen a sus receptores (RAGE) (Figura 2) (Prasad *et al.*, 2014).

PKC es una cinasa que permite la activación de la NADPHox, una enzima que produce  $O_2^{\cdot-}$ . Asimismo, la unión de los AGEs a sus receptores (RAGE) también activa a la NADPHox, además de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción que promueve a la expresión de una variedad de mediadores pro-inflamatorios (Prasad *et al.*, 2014; Argaw *et al.*, 2009).

Las EROs son moléculas que también actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales y activan numerosas vías de señalización sensibles al estrés como JNK, p38MAPK y PKC (Evans *et al.*, 2002; Gutowski y Kowalczyk, 2013; Niedowicz y Daleke, 2005; Trachootham *et al.*, 2008), y de esta manera afectan la expresión de genes cuyos factores de transcripción responden a estrés, o alteran vías de señalización como la de la insulina (Bashan 2009).



**Figura 2.** Esquema del metabolismo de la glucosa y el estrés oxidante (Prasad *et al.*, 2014)

Cuando hay una sobreproducción de EROs, además de repercutir en vías de señalización, pueden causar daño macromolecular contribuyendo a modificaciones en la estructura y función celular de lípidos, proteínas y ADN (Evans *et al.*, 2002; Matough *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011) en diferentes órganos como el cerebro (Muriach *et al.*, 2014; Biessels y Gispen, 2005; Jing *et al.*, 2013; Kuhad y Chopra, 2007; Kuhad *et al.*, 2008), favoreciendo el desarrollo de complicaciones a largo plazo (Niedowicz y Daleke, 2005; Yang *et al.*, 2011; Matough *et al.*, 2012).

### Especies reactivas del oxígeno como moléculas reguladoras de la conducta alimentaria

En relación a la regulación de la ingesta de alimentos, se ha descrito que el incremento transitorio de EROs hipotalámicas puede tener efectos anorexigénicos, mientras que su disminución por agentes antioxidantes como honokiol, trolox, glutatión

o catalasa tiene efecto orexigénico (Diano *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2006 Benani *et al.*, 2007; Jaillard *et al.*, 2006; Leloup *et al.*, 2006).

Las EROs hipotalámicas pueden ser producidas en la mitocondria durante el metabolismo de glucosa o lípidos (Benani *et al.*, 2007; Jaillard *et al.*, 2006; Leloup *et al.*, 2006) y también por la señalización de insulina o leptina mediante la activación de las NOX (Jaillard *et al.*, 2009; Onoue *et al.*, 2016; Storozhevkykh *et al.*, 2007). Por el contrario, la grelina puede disminuir la producción de EROs mediante la activación de las proteínas desacoplantes UCP2 (las cuales actúan como amortiguadores de EROs) en neuronas<sup>NPY/AgRP</sup> sin afectar la producción de EROs en neuronas<sup>POMC/CART</sup> (Diano *et al.*, 2012; 2013).

Sin embargo, los hallazgos mencionados anteriormente son controversiales respecto al papel de las EROs en la regulación de la ingesta de alimento. Se asume que el cerebro es uno de los órganos principalmente afectados por el estrés oxidante en la DM y a pesar del incremento en la producción de EROs, la hiperfagia se presenta. Aun así, debido a que la producción de EROs durante la DM ocurre de forma crónica, se considera que el desequilibrio generado entre oxidantes-antioxidantes en el hipotálamo sería responsable de las alteraciones en la conducta alimentaria que presentan los individuos diabéticos. Hasta el momento se desconoce el papel del estrés oxidante sobre la expresión de los neuropéptidos, hormonas y nutrientes en el cerebro. Sin embargo, se ha propuesto que la región principalmente afectada por DM es el ARC, específicamente en las neuronas<sup>POMC/CART</sup>, debido a que las neuronas<sup>NPY/AgRP</sup> expresan en mayor proporción a las UCP2 a diferencia de las neuronas<sup>POMC/CART</sup>, y las hace menos susceptibles a daño por estrés oxidante (Andrews *et al.*, 2008; Diano *et al.*, 2013; Drougard *et al.*, 2015; Horvath *et al.*, 2008; Purkayastha y Cai, 2013; Zorzano y Claret, 2015).

Dado que el hipotálamo tiene un papel clave en el control de la homeostasis de la glucosa, además de la regulación de la ingesta de alimentos y otras funciones, mantener su integridad resulta crucial para su funcionamiento correcto.

## **Fármacos empleados en el tratamiento de la DM**

El tratamiento de la DM se enfoca en mejorar el uso de la glucosa en los tejidos para normalizar al máximo posible los niveles de glucemia sin afectar el estilo de vida del paciente y como consecuencia, retrasar la aparición de las complicaciones diabéticas (Flórez *et al.*, 1998). En combinación con los tratamientos suministrados, se recomienda adoptar una dieta saludable, realizar mayor actividad física y mantener un peso corporal normal (IDF, 2017).

### **Metformina**

La metformina es un fármaco oral ampliamente utilizado y suele ser de los primeros en utilizarse para el tratamiento de la DM (ADA, 2017). Este fármaco disminuye las concentraciones de glucosa mediante la inhibición en la producción de glucosa hepática incrementa el consumo de glucosa por el músculo esquelético y disminuye la absorción de glucosa por el sistema gastrointestinal. Los mecanismos moleculares están asociados con el incremento de la actividad de AMPK y resulta en la estimulación del consumo de glucosa por el tejido muscular debido a que se promueve la expresión y translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) dependiente de insulina, además de inhibición de la gluconeogénesis hepática (Musi *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001; Onken y Driscoll, 2010). Sin embargo, otros hallazgos indican que el estrés oxidante puede afectar la expresión del transportador de glucosa GLUT4 (Pessler *et al.*, 2010), por lo que sería necesario considerar tratamientos complementarios que inhiban el estrés oxidante.

Por otra parte, existen estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que la metformina podría tener efectos importantes a nivel cerebral, regulando el apetito y suprimiendo la hiperfagia (Chau *et al.*, 2007; Stevanovic *et al.*, 2012) una característica que le convierte en un fármaco con distintos beneficios.

### **Nutraceuticos en el tratamiento de la DM**

A pesar de los avances que se tienen en la terapéutica para el control de la DM, numerosos tratamientos van acompañados de efectos colaterales, como cuadros de



hipoglucemia, problemas gastrointestinales, complicaciones cardiovasculares y déficit de la memoria, entre otros (Cheng y Fantus, 2005).

Las sustancias nutraceuticas llaman la atención por sus efectos pleiotrópicos, entre los que incluyen la disminución del estrés oxidante y procesos inflamatorios en distintas enfermedades crónicas (Bhanot y Shri, 2010). Actualmente se ha propuesto que estos compuestos pueden ayudar al tratamiento de la DM y prevenir o disminuir la progresión de las complicaciones diabéticas (Osawa y Kato, 2005; Verspohl, 2012), además de que son considerados escasamente tóxicos y con efectos secundarios menores que los fármacos sintéticos (Kook *et al.*, 2009; Khalaf y Whitford, 2010).

En estudios con animales diabéticos se ha visto que la administración de agentes nutraceuticos disminuye la hiperfagia (Thomson *et al.*, 2016); sin embargo, los mecanismos no están claros ni descritos, por lo que es necesario identificar el papel de los nutraceuticos en la modulación de la expresión y/o concentración de moléculas (tanto centrales como periféricas) implicadas en la regulación del apetito.

El extracto de ajo envejecido (EAE), la curcumina (Cur) y el resveratrol (Rsv) son sustancias que han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes, neuroprotectoras, antidiabéticas, entre otras funciones (Barragán-Bonilla, 2015; Jing *et al.*, 2013; Kuhad y Chopra, 2007; Thomson *et al.*, 2007).



Nuestro estudio pretende averiguar si la administración de antioxidantes exógenos, como el EAE, la Cur y el Rsv modulan la expresión de moléculas (como NPY, POMC, insulina y leptina) involucradas en la regulación de la ingesta de alimentos en hipotálamo de ratas diabéticas, y a la vez, describir un mecanismo por el cual ejercen estos efectos.

# **CAPÍTULO I.**

**Combined administration of streptozotocin and sucrose accelerates the appearance of type 2 diabetes symptoms in rats**

## Research Article

# Combined Administration of Streptozotocin and Sucrose Accelerates the Appearance of Type 2 Diabetes Symptoms in Rats

Martha Isela Barragán-Bonilla,<sup>1</sup> Juan Miguel Mendoza-Bello,<sup>1</sup> Penélope Aguilera ,<sup>2</sup>  
Isela Parra-Rojas ,<sup>3</sup> Berenice Illades-Aguilar,<sup>4</sup> Mónica Ramírez,<sup>5</sup>  
and Mónica Espinoza-Rojo <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria, Chilpancingo de los Bravo, Gro. 39090, Mexico

<sup>2</sup>Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Av. Insurgentes Sur 3877, Mexico City 14269, Mexico

<sup>3</sup>Laboratorio de Obesidad y Diabetes de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas S/N Ciudad Universitaria, Chilpancingo de los Bravo, Gro. 39090, Mexico

<sup>4</sup>Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria, Chilpancingo de los Bravo, Gro. 39090, Mexico

<sup>5</sup>CONACYT-Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Javier Méndez Aponte No. 1, Fracc. Servidor Agrario, Chilpancingo de los Bravo, Gro. 39070, Mexico

Correspondence should be addressed to Mónica Espinoza-Rojo; moniespinoza@yahoo.com

Received 11 January 2019; Revised 6 April 2019; Accepted 28 May 2019; Published 4 July 2019

Academic Editor: Bernard Portha

Copyright © 2019 Martha Isela Barragán-Bonilla et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Type 2 diabetes is a disease with a high global prevalence, characterized by chronic hyperglycemia, insulin resistance, polyphagia, polydipsia, polyuria, and changes in body weight. Animal models have been very useful for the study of this disease and to search for new therapeutic targets that delay, attenuate, or avoid diabetic complications. The purpose of this work was to establish a model of type 2 diabetes and exhibit the majority of the characteristics of the disease. Two-day-old male and female Wistar rats were treated once with streptozotocin (70 or 90 mg/kg body weight). After weaning, they were given a sucrose-sweetened beverage (SSB; sucrose at 10 or 30%) during 7 or 11 weeks; their body weight and food intake were measured daily. With the rats at 14 weeks of age, we determined the following: (a) fasting blood glucose, (b) oral glucose tolerance, and (c) insulin tolerance. We found that the supplementation of sucrose at 10% for 7 weeks in male rats which had previously been given streptozotocin (70 mg/kg) at neonatal stage leads to the appearance of the signs and symptoms of the characteristic of type 2 diabetes in adulthood.

## 1. Introduction

Type 2 diabetes is a multifactorial and degenerative disease characterized by chronic hyperglycemia and insulin resistance, in addition to symptoms such as polyuria, polydipsia, and polyphagia. Due to the magnitude of this problem worldwide [1, 2], the implementation of representative animal models to study this disease is relevant in order to improve treatments and to attenuate or avoid diabetic complications [3, 4].

Despite that there are many animal models that allow the study of some aspects of this disease, there is none, to our knowledge, that shows the majority of the features of type 2 diabetes [3, 4]. In some models, hyperglycemia is induced in adult rats by the administration of streptozotocin (STZ); the mechanism of action is through the selective destruction of pancreatic  $\beta$  cells by oxidative stress. Consequently, this decreases insulin in circulation, increases the blood glucose level, and brings on the presence of severe symptoms [5–8].

STZ has also been used in neonatal rats (nSTZ model) to generate a similar model of type 2 diabetes. This animal model generates partial damage to pancreatic  $\beta$  cells, due to regeneration of these cells at neonatal age, which favors the presence of glucose intolerance, insulin resistance, and insulin deficiency in early adulthood [9–13]. In the literature, we find widely employed protocols to induce diabetes through the administration of STZ; the latter has been used at mild-to-high doses (range, 70–150 mg/kg) at different postnatal ages (2–5 days of age). This diversity of protocols reflects a low efficiency for their use as study models of the disease. In fact, it has been reported that there is no reproducibility in the generation of alterations associated with type 2 diabetes [10–23]. Therefore, it is important to establish a model of type 2 diabetes that manifests the majority of the characteristics of the disease.

On the other hand, it has been reported that high-fat and high-carbohydrate diets, or supplementation with sweetened beverages for a long time period, leads to the generation of a model of insulin resistance and obesity. However, there is a wide variety of protocols, in addition to the fact that special solid diets are expensive and supplementation with sweetened beverages is often used for excessively long time periods [24–27].

In this context, the purpose of this study was to evaluate a different model to study type 2 diabetes by using STZ—in 2 days old rats—in combination with sweetened beverages (sucrose-sweetened beverage (SSB)) and to determine if that combination accelerates the establishment of type 2 diabetes symptoms in rats.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Animals.** Two days old male ( $n = 70$ ) and female ( $n = 68$ ) Wistar rats were used, which were donated by the National Institute of Neurology and Neurosurgery “Manuel Velasco Suárez” (INNN), Mexico City. During the study, the rats were maintained under constant humidity (50–60%) and temperature (21–25°C), with light and dark cycles of 12 h/12 h and free access to food (Harlan’s standard commercial diet No. 2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Diet) and water. They were treated with the greatest possible care to avoid pain and suffering, under the conditions indicated in Mexican NOM-062-ZOO-1999 (Technical Specifications for the Production, Care and Use of Laboratory Animals) and the rules established by the Ethics Commission of the INNN, Protocol 32/17 with document No. CICUAL/SO/VI/22617/028/2017.

**2.2. Experimental Protocols.** We included two experimental protocols to induce alterations in glucose homeostasis: experimental protocol A: a single dose of STZ (Cat. number S0130; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and experimental protocol B: a single dose of STZ with SSB:

- (A) Wistar rats (two days old) were fasted for 8 h, while being separated from their mothers; then, they received either vehicle (25  $\mu$ l of buffer 0.1 M sodium citrate pH 4.5) or a single dose of STZ (70 or

90 mg/kg body weight) via intraperitoneal (i.p.) injection. For each experimental group, the rats were randomly divided into three groups (Control, Stz70, and Stz90). The rats were immediately returned to their mothers and weaned at 21 days of age (Figure 1)

- (B) High-sugar diets are determinant for establishing insulin resistance. For that reason, different groups of rats were formed with and without the neonatal administration of 70 mg of STZ. After weaning, the rats were supplemented with 10% or 30% SSB during 7 or 11 weeks (standard commercial sucrose according to the specifications of NOM051-SCFI/SSA1/2010) with the objective of determining the adequate concentration of sucrose and the time for it to be administered. The Control group received only vehicle of STZ (Figure 1)

Rats of both experimental protocols were organized randomly into 11 study groups as follows: (a) Control group, rats not exposed to either STZ or SSB (males  $n = 9$ , females  $n = 9$ ); (b) Stz70 group, animals treated with a single dose of 70 mg of STZ (males  $n = 8$ , females  $n = 9$ ); (c) Stz90 group, animals with a single dose of 90 mg of STZ (males  $n = 4$ , females  $n = 2$ ); (d) C+10% 7w group, control animals treated with 10% SSB during 7 weeks (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ); (e) C+10% 11w group, control animals treated with 10% SSB during 11 weeks (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ); (f) C+30% 7w group, control animals treated with 30% SSB during 7 weeks (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ); (g) C+30% 11w group, control animals treated with 30% SSB during 11 weeks (males  $n = 6$ , females  $n = 7$ ); (h) Stz70+10% 7w group, animals treated with a single dose of 70 mg of STZ and 10% SSB during 7 weeks (males  $n = 7$ , females  $n = 6$ ); (i) Stz70+10% 11w group, animals treated with a single dose of 70 mg of STZ and 10% SSB during 11 weeks (males  $n = 6$ , females  $n = 5$ ); (j) Stz70+30% 7w group, animals treated with a single dose of 70 mg of STZ and 30% SSB during 7 weeks (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ); and (k) Stz70+30% 11w group, animals treated with a single dose of 70 mg of STZ and 30% SSB during 11 weeks (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ).

After weaning, the rats were placed in cages with four rats per cage. At 5 weeks of age, the rats were sexed and housed in cages with two animals each. Afterward, at 6 weeks of age, the rats were separated into individual boxes and were handled periodically to habituate them to management during the monitoring of the parameters, allowing us to measure parameters that would permit the complete diagnosis of diabetes.

**2.3. Evaluation of the Diabetic Condition.** At 8 weeks of age, body weight and food intake were measured daily for 6 weeks to determine changes in body weight and polyphagia. At weeks 10 and 14, the fasting blood glucose level was measured to determine whether the animals had hyperglycemia. Additionally, at week 14, an oral glucose tolerance test (GTT) and an insulin tolerance test (ITT) were performed to assess alterations in glucose homeostasis and insulin sensitivity, respectively (Figure 1).

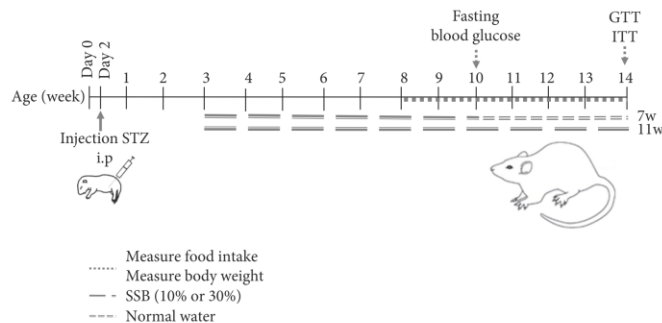


FIGURE 1: Experimental scheme of diabetes induction in Wistar rats. Two-day-old male and female rats were injected with STZ (70 or 90 mg/kg) intraperitoneally (i.p.). The rats were immediately returned to their mothers and weaned at 21 days of age. In addition, rat groups with and without 70 mg of STZ/kg body weight were supplemented with SSB (standard commercial sucrose) at 10% or 30% for either 7 or 11 weeks after weaning. The Control group was included that was not exposed to STZ nor to SSB. Body weight and food intake were monitored daily for 6 weeks (when the rats were 8-14 weeks of age), and fasting blood glucose was measured at weeks 10 and 14 of age. Afterward, the insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT) were performed at week 14.

**2.4. Measurement of Body Weight and Food Intake.** Body weight was measured on an analytical scale with a basket added for this purpose. To measure food intake daily, pellets of food were previously weighed and placed in the cages at 8:00 am; after 24 h, pellets were removed and weighed again. The result was adjusted to the body weight (g of food/100 g body weight per day).

**2.5. Measurement of Fasting Blood Glucose Levels, GTT, and ITT.** The blood glucose concentration was evaluated with an 8 h fast. The OneTouch® Ultra™ diagnostic kit was used, following the manufacturer's instructions. For the GTT, the animals were given glucose (2 g/kg body weight) orally [15], and for the ITT, they were injected with insulin (0.5 IU/kg body weight) i.p. Then, glucose concentrations were monitored at 30, 60, and 120 min after the administration of glucose or insulin. Rats with fasting glucose  $\geq 200$  mg/dl were considered hyperglycemic, and the GTT was not performed on these animals.

The ITT was employed to determinate insulin resistance, which is quite a simple, fast, reproducible, and inexpensive assay, and previous research has validated and compared it with other tests that have a greater acceptance to determine insulin resistance, like mathematical model HOMA-IR and euglycemic hyperinsulinemic clamp, and have shown a positive correlation [28, 29].

**2.6. Data Analysis.** Data are expressed as the median and interquartile range (IQR, p25-p75). Normality of data was evaluated by the Shapiro-Wilk test. Data of the GTT and ITT are represented in percentages, considering the initial glucose value as 100%. The area under the curve (AUC) was calculated using the trapezoidal rule. The variation between more than two groups was measured by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn Multiple Comparison Test. The analysis was performed using the GraphPad

Prism ver. 5.0 statistical software. The statistical significance was considered with a value of  $p < 0.05$ .

### 3. Results

**3.1. Effects of the Administration of STZ at Neonatal Age on Survival and Glucose Tolerance.** We injected 90 mg of STZ into 42 male and 38 female rats and found that this dose induced high mortality (90.5 and 94.7%, respectively) during the first days after STZ administration. In contrast, 39 male and 37 female rats were injected with 70 mg of STZ, and a high percentage of animals of this group survived, with 84.6 and 86.5%, respectively (data not shown).

The rats from the Stz90 group, which survived and reached adulthood (14 weeks-of-age), had a fasting blood glucose level close to (female rats) or greater than 200 mg/dl (male rats) (both  $p < 0.05$  vs. the Control groups). In contrast, animals from the Stz70 group showed a fasting glucose level near that of the Control group (Table 1).

To confirm alterations in glucose tolerance in rats that received neonatal STZ and had fasting glycemia of  $< 200$  mg/dl (i.e., male and female rats from the Stz70 group and females from the Stz90 group), the GTT was performed and the AUC was calculated. After 30, 60, and 120 min of the administration of glucose via oral, the blood glucose level in both groups of male and female rats was higher than that of the Control group ( $p < 0.001$ ). In addition, the AUC of both groups formed by males (Stz70: AUC = 796.2) and females (Stz70: AUC = 822.4; Stz90: AUC = 1,165) was higher than the AUC of the Control group ( $p < 0.05$ ; AUC of male control: 505.4, AUC of female control: 547.5; Table 2). The data showed the presence of glucose intolerance in these groups.

**3.2. Effects of the Administration of STZ at Neonatal Age on Insulin Sensitivity.** An ITT was performed to determine whether the administration of STZ affects the body's efficiency in response to exogenous insulin. For this purpose,



TABLE 1: Fasting blood glucose (mg/dl) of rats at 10 and 14 weeks of age of experimental protocol A. The data shown are of the Control (males  $n = 9$ ,  $n$  females  $n = 9$ ), Stz70 (males  $n = 8$ , females  $n = 9$ ), and Stz90 (males  $n = 4$ , females  $n = 2$ ) groups. Values are expressed as the median and interquartile range (IQR) (p25-p75). The Kruskal-Wallis test was used for testing the statistical significance between groups of data, in addition to a posthoc Dunn Multiple Comparison Test (Control, Stz70, and Stz90). The asterisk denotes that the data are significantly different from the Control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ), and the plus sign denotes that the data are significantly different from the Stz70 group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ).

	Male		Female	
	10 <sup>th</sup> week	14 <sup>th</sup> week	10 <sup>th</sup> week	14 <sup>th</sup> week
Control	97 (91.3-116.8)	106.5 (94.5-119.5)	93 (92-118)	96.5 (89.5-105)
Stz70	129.5 (120.3-144.8)	131 (107-248)	131.5 (106.5-153.5)	138.5** (113-206)
Stz90	164.5 (119-224)	278.5**+ (228.3-395.5)	190.5** (151.3-276.3)	190** (174.3-247)

insulin was administered i.p., and we measured blood glucose levels after 30, 60, and 120 min. We found that there was a diminished response to insulin only after 30 min in male rats from the Stz70 group and in male and female rats from the Stz90 group in comparison with the Control group (glucose level approximately 8, 19, and 50% higher than that of the Control group at 30 min, respectively;  $p < 0.05$ ). These data indicate a low response to insulin. However, according to the AUC of different groups comprising males and females, it did not exhibit any change in comparison with the Control group; therefore, these data, taken together, demonstrate a mild resistance to insulin (Table 2).

**3.3. Administration of 90 mg of STZ at Neonatal Age Altered Body Weight and Induced Polyphagia.** To identify the presence of the symptoms of diabetes as changes in body weight and polyphagia, we measured body weight and food intake daily for 6 weeks (8-14 weeks of age). During that period, male and female rats from the Control group had a body weight gain of 152 and 78 g, respectively. Male and female rats from the Stz70 group demonstrated a similar body weight gain to that of the Control group (150.5 and 68.1 g, respectively). In contrast, in the Stz90 groups formed by male and female rats, a lower body weight gain was found (a difference of approximately 30–50 g vs. the Control group;  $p < 0.05$ ) (Table 5).

In relation to food intake, male and female rats from the Control group had a food intake of 6.9 and 7.7 g/100 g of body weight, respectively. We observed that there was a significant increase in daily food intake in males and females of the Stz90 group (12.2 and 13.2 g/100 g of body weight, respectively,  $p < 0.0001$ , compared with the Control group). In contrast, male and female rats from the Stz70 group did not show any changes in food intake in comparison with the Control group (Table 5).

**3.4. Effects of the Supplementation of SSB on Fasting Blood Glucose and Glucose Tolerance in Rats with Previous Inoculation of STZ at Neonatal Age.** Considering that the administration of 70 mg of STZ promotes alterations in glucose homeostasis without affecting its concentration in terms of fasting state, body weight, or food intake, this dose was

selected and combined with SSB (10% or 30% sucrose for 7 or 11 weeks; Figure 1).

Control rats that were given SSB at different concentrations and duration times (C+10% 7w, C+10% 11w, C+30% 7w, and C+30% 11w) showed their fasting blood glucose level in a range similar to that of the Control group regardless of sex. In contrast, rats with 70 mg of STZ and SSB exhibited an increase in the blood glucose level in all groups of both sexes (Stz70+10% 7w, Stz70+10% 11w, Stz70+30% 7w, and Stz70+30% 11w;  $p < 0.05$  vs. Control). However, only the Stz70+10% 7w group revealed an increase in glucose of >200 mg/dl in male rats (Table 3).

The GTT was carried out to evaluate the effect of SSB on glucose tolerance in rats with a previous administration of neonatal STZ that had a fasting glycemia of <200 mg/dl. The data from the AUC showed that 30% SSB for 7 weeks generated glucose intolerance in male rats ( $p < 0.05$ ; AUC = C+30% 7w: 650.4 vs. Control: 505.4). In contrast, groups made up of females did not show changes in the blood glucose level in response to oral glucose load with respect to the Control group (Table 4).

On the other hand, with supplementation of 10% or 30% SSB at either 7 or 11 weeks after weaning, male rats treated with neonatal STZ showed higher glucose intolerance (AUC = Stz70+10% 7w: 722.1, Stz70+10% 11w: 737.8, Stz70+30% 7w: 984.6, and Stz+30% 11w: 876.8) than control animals (AUC = 505.4;  $p < 0.05$ ) (Table 4). In the same way, female rats with neonatal STZ and supplemented with SSB during different periods, as expected, presented higher glucose intolerance than that of the Control group (AUC = Stz70+10% 7w: 630, Stz70+10% 11w: 708.3, Stz70+30% 7w: 859, and Stz70+30% 11w: 1.081;  $p < 0.05$  vs. Control: 547.5) (Table 4).

**3.5. Effects of Supplementation of SSB on Insulin Resistance in Rats with Previous Inoculation of STZ at Neonatal Age.** In relation to the evaluation of insulin resistance through the ITT, we found that, in male rats, insulin sensitivity was significantly diminished after 30 min postinsulin in male rats from the C+10% 7w, C+30% 7w, and Stz70+10% 7w groups (glucose level approximately 30% higher than that of the Control group after 30 min, respectively;  $p < 0.05$ ). This data indicated a low response to insulin

TABLE 2: Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) of rats of experimental protocol A. The data shown are of the Control (males  $n = 9$ , females  $n = 8$ , females  $n = 9$ ), and Stz90 (males  $n = 4$ , females  $n = 2$ ) groups. Data are represented in percentages, considering the initial glucose value as 100%. Values (except initial glucose) are expressed as the median and interquartile range (IQR) (p25-p75). For the GTT, rats were given glucose (2 g/kg body weight) orally, and for the ITT, they were injected with insulin (0.5 IU/kg body weight) i.p. Blood glucose level was monitored at 30, 60, and 120 min after the administration of glucose or insulin. The area under the curve (AUC) was calculated using the trapezoidal rule in GraphPad Prism. Variation between more than two groups was measured by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn Multiple Comparison Test. The asterisk denotes that data are significantly different from the Control group (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ ), and the plus sign denotes that the data are significantly different from the Stz70 group (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

	GTT				ITT					
	0 min	30 min	60 min	120 min	AUC	0 min	30 min	60 min	120 min	AUC
Control	100	147.5 (116.1-180.6)	133.1 (129.7-156)	114.3 (97.46-133)	505.4 (459.4-575.2)	100	55.4 (51.08-63.73)	68.8 (48.96-74.9)	80	288.7 (247.2-303.2)
	100	236** (190.9-279.4)	216.7** (195.5-247.7)	184.1** (151.3-192.2)	796.2*** (689.5-860.8)	100	63.6* (61.8-89.8)	58 (37.1-66.7)	76.6 (48.2-98.8)	279 (213.8-362.4)
Stz90	—	—	—	—	—	100	50 (23.3-95.2)	40.4 (23.6-77.9)	38.4 (32.9-75.6)	179.8 (142.9-318.7)
Control	100	174.7 (143.9-196.4)	149 (125.3-160.5)	113.3 (101.5-149.7)	547.5 (484.1-632.7)	100	54.4 (52.3-60.2)	64.2 (48.5-75)	87.5 (72.7-101.1)	315.9 (258.2-352)
	100	253.7** (205.7-286.5)	243.4*** (227.8-277.2)	158.3 (118.4-220.6)	822.4** (803.7-926.2)	100	73.3* (56.9-123.5)	75.2 (49.6-121.7)	110.5 (79.8-142.9)	318.8 (230.6-342.9)
Stz90	100	364.7*** (332-397.4)	320*** (319.5-320.5)	269.7*** (230.8-308.6)	1165*** (1092-1237)	100	104.5* (77.4-131.6)	94.4 (43.4-145.8)	71.6 (21.2-122.1)	368 (213.6-522.4)



TABLE 3: Fasting blood glucose (mg/dl) in rats 10 and 14 weeks of age of experimental protocol B. The data shown are of the Control (males  $n = 9$ , females  $n = 9$ ), C+10% 7w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ), C+10% 11w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ), C+30% 7w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ), C+30% 11w (males  $n = 6$ , females  $n = 7$ ), Stz70 (males  $n = 8$ , females  $n = 9$ ), Stz70+10% 7w (males  $n = 7$ , females  $n = 6$ ), Stz70+10% 11w (males  $n = 6$ , females  $n = 5$ ), Stz70+30% 7w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ), and Stz70+30% 11w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ) groups. Values are expressed as the median and interquartile range (IQR) (p25-p75). Variation between more than two groups was measured by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn Multiple Comparison Test. The asterisk denotes that the data are significantly different from the Control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ), and the plus sign denotes that the data are significantly different from the Stz70 group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ).

	Male		Female	
	10 <sup>th</sup> week	14 <sup>th</sup> week	10 <sup>th</sup> week	14 <sup>th</sup> week
Control	97 (91.25-116.8)	106.5 (94.5-119.5)	93 (92-118)	96.5 (89.5-105)
C+10% 7w	110 (91-121)	111 (98.5-130.5)	103 (99-107.5)	113 (104.8-118.5)
C+10% 11w	110 (99-161)	124 (107.3-131.8)	105.5 (98-118)	109.5 (100.3-114.3)
C+30% 7w	99.5 (94.7-108)	92.5 (84.7-109)	105 (94.5-111)	100 (94.2-104.3)
C+30% 11w	111.3 (98.7-129.8)	104 (94-111.8)	117 (98.5-125)	115 (94.7-124.5)
Stz70	129.5 (120.3-144.8)	131 (107-248)	131.5 (106.5-153.5)	138.5** (113-206)
Stz70+10% 7w	125 (99.7-165.3)	277* (150.8-361.3)	145.5 (138.5151)	190*** (159.3-223.3)
Stz70+10% 11w	137.5 (113-186.3)	186.5* (171.8-295.3)	125.5 (122-129)	172.5** (139-206)
Stz70+30% 7w	119.5 (99.7-126.5)	157 (136-226.8)	138 (116.5155)	160.5*** (140.8-183.8)
Stz70+30% 11w	108 (99-131)	154 (120.3-208.5)	110 (83-125.5)	173.8*** (156.8-202.4)

in these groups. However, data from AUC showed a lower response only in the C+10% 11w and C+30% 7w groups (AUC = 341.4 and 375.5, respectively, vs. 288.7 of the Control group;  $p < 0.05$ , Table 4).

In contrast, female rats with neonatal STZ plus 10 or 30% SSB administered for 7 weeks revealed an increase in insulin sensitivity (AUC = 184.4 and 199.6, respectively, vs. 315.9 in the Control group;  $p < 0.05$ ) (Table 4). The remainder of the groups formed by female rats showed a similar response to insulin to that of the Control group (Table 4).

**3.6. Effects of Supplementation of SSB on Body Weight and Polyphagia in Rats with Previous Inoculation of STZ at Neonatal Age.** Supplementation with 10 or 30% SSB either for 7 or for 11 weeks in males without neonatal STZ promoted a higher body weight gain of approximately 30 g in comparison with the Control group ( $p < 0.05$  vs. Control). On the other hand, in males with STZ plus 10% SSB during 7 or 11 weeks, a lower body weight gain was favored (a difference was found of 50-60 g vs. Control;  $p < 0.05$ ). In groups made up of females, there were no changes in body weight gain (Table 5).

Regarding food intake, we observed that there was an increase in daily food intake in males of the Stz70+30% 7w and Stz+10% 7w groups (9.3 and 12.3/100 g body weight, respectively;  $p < 0.05$  vs. 6.9/100 g body weight of

the Control group). In contrast, the groups of male and female rats with and without neonatal STZ that were supplemented with 10 or 30% SSB permanently (11 weeks) exhibited a decrease in daily food intake compared with the Control group ( $p < 0.05$ ) (Table 5).

#### 4. Discussion

In our research, we found that 90 mg of STZ induced the majority of the characteristics of diabetes (hyperglycemia, low body weight gain, and polyphagia) in both males and females; in fact, this dose is widely used [9, 15, 25, 30, 31]. However, its implementation in this research is difficult as a study model due to that it promotes high mortality in animals.

On the other hand, we demonstrated that 70 mg of STZ only generates glucose intolerance, without affecting body weight gain or food intake. Its lower effect could be due to the damage generated to pancreatic  $\beta$  cells dependent on the concentration of STZ [9, 12]. It will be determinant to evaluate the damage level in pancreatic  $\beta$  cells in both models.

As part of the establishment of a type 2 diabetes model, a single dose of 70 mg of STZ was selected to be employed in combination with SSB (10 or 30%) during either 7 or 11 weeks. This is due to the fact that the injection of this dose only induces glucose intolerance, without affecting body

**TABLE 4:** Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) of rats of experimental protocol B. The data shown are of the Control (males  $n = 9$ , females  $n = 9$ ), C+10% 7w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ), C+30% 7w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ), C+30% 11w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ), C+30% 11w (males  $n = 7$ , females  $n = 8$ ), Stz70+10% 7w (males  $n = 7$ , females  $n = 6$ ), Stz70+10% 11w (males  $n = 6$ , females  $n = 5$ ), Stz70+30% 7w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ), and Stz70+30% 11w (males  $n = 6$ , females  $n = 6$ ) groups. Data are represented in percentages, considering the initial glucose value as 100%. Values (except initial glucose) are expressed as the median and interquartile range (IQR) (p25-p75). For the GTT, the rats were given glucose (2 g/kg body weight) orally, and for the ITT, they were injected with insulin (0.5 IU/kg body weight) i.p. Blood glucose level was monitored at 30, 60, and 120 min after the administration of glucose or insulin. The area under the curve (AUC) was calculated using the trapezoidal rule in GraphPad Prism. Variation between more than two groups was measured by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn Multiple Comparison Test. The asterisk denotes that the data are significantly different from the Control group ( $*p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ), and the plus sign denotes that the data are significantly different from the Stz70 group ( $+p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ , and +++ $p < 0.001$ ).

	GTT					ITT				
	0 min	30 min	60 min	120 min	AUC	0 min	30 min	60 min	120 min	AUC
<b>Male</b>										
Control	100	147.5 (116.1-180.6)	133.1 (129.7-156)	114.3 (97.46-133)	505.4 (459.4-575.2)	100	55.4 (51.08-63.73)	68.8 (48.96-74.9)	80 (58.6-89.3)	288.7 (247.2-303.2)
C+10% 7w	100	151.3 (118.5-167.7)	137.7 (104.6-178.6)	98.8 (93.86-119.5)	532.3 (429.2-569.4)	100	<b>82.9*</b> (62.6-87.8)	62.22 (55.1-88.2)	80.18 (76.8-123.5)	334 (274.2-377.8)
C+10% 11w	100	144.3 (123.8-154.1)	131.2 (105.4-146.2)	104.9 (77.34-129.6)	474.4 (429.4-543.6)	100	69.5* (63.2-73)	79.1 (71.7-88.3)	95.2 (91-104.3)	<b>341.4**</b> ( <b>320.8-346.7</b> )
C+30% 7w	100	202.4 (165.5-235.5)	175.4* (149.7-202.9)	153.9* (126.4-177.2)	650.4* (573-775.4)	100	<b>85.91**</b> (69.4-100.3)	92.94 (65-97.6)	100* (87.1-117)	<b>375.4*</b> ( <b>298.2-426.8</b> )
C+30% 11w	100	176.2 (146.1-203)	143.4 (132.4-168)	129.5 (115.8-156.3)	596.8 (521.8-640.8)	100	72.9* (60.3-84.3)	76.6 (50.5-92.6)	104.8* (81.3-132.3)	343.5 (290-378.1)
Stz70	100	236** (190.9-279.4)	216.7** (195.5-247.7)	184.1** (151.3-192.2)	796.2*** (689.5-860.8)	100	<b>63.57*</b> (61.8-89.8)	58.02 (37.1-66.7)	76.58 (48.2-98.8)	291.4 (268.2-369.1)
Stz70+10% 7w	100	205.3 (162.2-232.5)	205.7* (159.3-230.1)	158.2 (114.8-184.9)	722.1* (568.9-809.7)	100	<b>86.49*</b> (58.3-115.2)	55.56 (24.1-76)	49.69 (23-89.5)	289.3 (165.4-364.1)
Stz70+10% 11w	100	209.8 (145.5-280.9)	202.7 (142.3-219.6)	156.3 (108.8-188.8)	737.8 (526.7-822.4)	100	72.58 (48.9-91.8)	56.56 (33.4-81.1)	72.59 (41.3-88.8)	291.5 (191.2-339.8)
Stz70+30% 7w	100	282.2 (172.1-303.8)	278.3* (172.4-322.3)	228.3* (143.1-242)	984.6* (633-1064)	100	65.09 (52.6-69.2)	40.57 (37.4-78.1)	40.54 (34.6-66.8)	215.4 (193.8-314.7)
Stz70+30% 11w	100	242.7* (208.9-270.8)	254.5* (160.7-291.4)	202.3 (126.9-224.4)	876.8* (626.9-982.4)	100	55.9* (52.7-65)	37.3 (34.6-55.4)	57.8 (51.4-92.3)	229.8 (208.3-283)
<b>Female</b>										
Control	100	174.7 (143.9-196.4)	149 (125.3-160.5)	113.3 (101.5-149.7)	547.5 (484.1-632.7)	100	54.4 (52.3-60.2)	64.2 (48.5-75)	87.5 (72.7-101.1)	315.9 (258.2-352)
C+10% 7w	100	151 (125.6-171.3)	142.3 (122.6-156.7)	107.6 (90.11-138.9)	513.8 (487.6-565.6)	100	57.58 (55.4-59.6)	52.08 (49.9-54.4)	81.3 (67-93.5)	265.6 (258.1-275.2)
C+10% 11w	100	169 (150-216.3)	132.1 (120.4-152.1)	113.1 (101.7-142.9)	509 (492.3-637.3)	100	60.8 (52.2-67.2)	59.45 (42.5-72)	86.6 (73.6-110)	286.8 (243.6-330.7)
C+30% 7w	100	145.2 (125.7-166.6)	161.8 (128.6-200.7)	113.8 (103.2-133.1)	563.9 (417.7-638.6)	100	56.76 (51.9-67.8)	47.8 (39.7-61.5)	64.1* (56.3-82.7)	248.4 (217.7-286.9)
C+30% 11w	100	217 (125.7-236.5)	149 (116.9-177.5)	126.4 (102.9-158.6)	631.4 (427.7-708.5)	100	57.83 (51.9-90.5)	62.3 (56.1-87.8)	101.1 (85.2-161.9)	301.9 (263.3-437.4)

TABLE 4: Continued.

	GTT						ITT			
	0 min	30 min	60 min	120 min	AUC	0 min	30 min	60 min	120 min	AUC
Stz70	100	253.7** (205.7-286.5)	243.4**** (227.8-277.2)	158.3 (118.4-220.6)	822.4** (803.7-926.2)	100	73.3 (56.9-123.5)	75.2 (49.6-121.7)	110.5 (79.8-142.9)	318.8 (230.6-342.9)
Stz70+10% 7w	100	198 (178-272.4)	175.6** (167.5-189.7)	82.7** (71.03-90.24)	630 (582-677.9)	100	37.6*** (34.7-40.4)	32.8** (30.1-35.6)	47.6** (47-48.2)	184.4*** (182.5-186.2)
Stz70+10% 11w	100	225.7* (225.7-282.4)	196.1** (196.1-243.4)	138.3+ (125-138.3)	708.3* (693-725.2)	100	63.53 (60.2-66.9)	49.63 (49.6-49.6)	82.05 (79.1-85)	270.5 (221.3-299)
Stz70+30% 7w	100	260.5**** (251.1-275.4)	259.1**** (219.5-284)	145.5 (108.7-182.9)	859**** (752.5-903.7)	100	45.14 (39.5-65.5)	41.08* (31.1-55.7)	49.69* (43.7-80.5)	199.6** (185.9-286.4)
Stz70+30% 11w	100	252.5* (205.7-282.9)	286.6** (268.8-329.7)	238.2** (220.6-253.8)	1081** (994-1245)	100	51.34 (41.9-60.8)	59.95 (56.2-63.7)	86.06 (85-87.2)	277.4 (274.6-280.1)

TABLE 5: Body weight gain (g in body weight) and food intake daily (g of food/100 g of body weight). The data shown are of the rats of experimental protocols A and B. Body weight and food intake were monitored daily for 6 weeks (8-4 weeks of age). Values are expressed as the median and interquartile range (IQR) (p25-p75). Variation between more than two groups was measured by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn Multiple Comparison Test. The asterisk denotes that the data are significantly different from the Control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ), and the plus sign denotes that the data are significantly different from the Stz70 group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ).

	Body weight gain		Food intake daily	
	Male	Female	Male	Female
Control	152.6 (138.7-170)	78.2 (66.1-85)	6.9 (6.5-7.4)	7.7 (7.1-8.4)
Stz70	150.5 (122.2-166.4)	68.1 (56.3-77.7)	7.6 (6.8-8.9)	8 (7.3-10.3)
Stz90	<b>99.9**+</b> (74.3-121.5)	51* (36.1-65.9)	12.2***+++ (11.3-12.9)	<b>13.2***++</b> (11.8-14.1)
C+10% 7w	178.6 (137.8-190)	62.6 (62-77.8)	6.9 (6.5-7.1)	7.2 (6.4-7.6)
C+10% 11w	<b>182.6**</b> (179-201.8)	93.3 (79.5-95.1)	4.6*** (4.1-4.9)	4.5*** (3.8-5)
C+30% 7w	<b>177*</b> (160.5-202.8)	66.6 (50.5-74.1)	6.9 (6.1-7.6)	7.7 (5.9-8.8)
C+30% 11w	165.7 (128.9-185.3)	83.1 (70.8-113.6)	4.5*** (4-4.7)	3.8*** (3.3-5.7)
Stz70+10% 7w	<b>106.8**</b> (90.6-131.7)	72.3 (62.6-108.7)	<b>12.3***+++</b> (11.3-13.5)	7.8 (6.5-9.3)
Stz70+10% 11w	<b>89.9***++</b> (56.6-97.9)	88.8 (78.2-105.3)	4.6***++ (4.1-5.4)	5.5***+++ (4.4-5.6)
Stz70+30% 7w	145.4 (141.8-150)	67.4 (66.9-87.3)	9.5* (6.6-10.7)	7.3+ (6.7-8)
Stz70+30% 11w	130.9 (102-170)	83.6+ (74.4-92.9)	4.3***+++ (3.8-4.4)	4.2***+++ (3.8-4.9)

weight or food intake. Additionally, we included control groups with SSB (10 or 30%) during either 7 or 11 weeks in order to discard those alterations in glucose homeostasis generated solely by SSB.

In our study, we found that supplementation with SSB in male and female rats without the administration of STZ did not affect the fasting blood glucose levels neither the normal response to the administration of glucose in GTT. Despite the fact that previous reports have demonstrated that only SSB or a high-carbohydrate diet during a chronic period leads to impairment to glucose homeostasis and obesity [24–27] in our study, supplementation with SSB was not a sufficient factor to generate alterations in glucose homeostasis, because SSB was given for a shorter time (7 or 11 weeks) in comparison with other studies. It is probable that the organism can compensate for the high sucrose intake through beverages by promoting greater synthesis and the release of insulin from pancreatic  $\beta$  cells. Therefore, it is possible that hyperinsulinemia is responsible for avoiding an abnormal response in the GTT. Actually, it has been described that an increased metabolic demand induces an increase of  $\beta$  cell's function or  $\beta$  cell mass expansion to compensate for the condition.  $\beta$  cell mass expansion can be due to the self-duplication of preexisting  $\beta$  cells or to the transdifferentiation of pancreatic  $\alpha$  cells [32, 33]. In future studies, it will be necessary to measure

the concentration of insulin and to identify the  $\beta$  cell mass expansion that would permit us to explain this finding with precision.

In the case of rats with STZ plus SSB at different concentrations and times, we found that SSB stimulated an increase in baseline blood glucose concentration and a low response to glucose administered in the GTT. The mechanism of action of STZ administered at the neonatal age is to induce partial damage to the pancreatic  $\beta$  cells, thus generating alterations in glucose homeostasis and the symptomatology of diabetes in a gradual manner in adulthood. This means that pancreatic  $\beta$  cells will still be able to produce insulin in response to high blood glucose levels (e.g., after eating food) [9–13]. In this manner, by constantly stimulating the production of insulin through a moderate intake of sucrose in a beverage, it could promote the development of greater damage to the pancreatic  $\beta$  cells. Due to partial damage of pancreatic  $\beta$  cells at the neonatal age, the capacity of expansion of  $\beta$  cells can be limited in these rats, resulting in a failure to compensate for increased metabolic needs [34]. This event, therefore, could promote the establishment of fasting hyperglycemia in rats with STZ and SSB.

Interestingly, fasting hyperglycemia is more pronounced in groups with STZ plus SSB at low concentrations and short time periods (i.e., 10% of sucrose for 7 weeks). This effect could be explained as due to an effect of the compensation

of the organism, meaning that, when rats are supplemented with a higher concentration of sucrose (30%) and at a prolonged time (11 weeks), there is an adaptation of the functional  $\beta$  cell mass to promote greater production of insulin by the pancreatic  $\beta$  cells, preventing with this the early establishment of the symptoms of diabetes [9–13]. Thus, it is thought that with low concentrations of sucrose during a short time period, the adaptation stage of the organism does not occur; thus, the damage generated in the  $\beta$  cells becomes more evident in earlier stages with hyperglycemia and the symptoms of diabetes [34].

In relation to insulin resistance, a key characteristic of type 2 diabetes mellitus, previous reports have shown that the administration of neonatal STZ induces insulin resistance [14, 17, 18]. In this study, the injection of 70 mg of STZ in male and female rats or 90 mg of STZ in female rats leads to a mild response to exogenous insulin. Likewise, male control rats that were given 10 or 30% SSB for 7 weeks and male rats that received 10% SSB during the same period with a previous injection of STZ showed mild insulin resistance. Insulin intolerance appears to be greater than in rats with only an injection of STZ. This could be due to the fact that in addition to neonatal STZ, the sucrose has been reported as a factor that promotes insulin resistance [24, 27]. However, it is necessary to determine whether this low insulin response is due to the poor density of insulin receptors on tissues, defects in its signaling pathway, or the oxidative damage of exogenous insulin [35, 36].

In contrast, in groups formed by females, supplementation with SSB do not change insulin tolerance. This condition could be due to the fact that the animals utilized in this study were young adults and, at this stage, the high estrogen levels in females act as a protective factor against the development of diabetes [37, 38], thus avoiding the appearance of hyperglycemia and the rest of the characteristic diabetic symptoms in females.

Otherwise, we observed that a prolonged intake of SSB (11 weeks) led to a decrease in food intake in all groups of both sexes; this can be because chronic exposure to a moderate or high concentration of sucrose might promote satiety. It is probable that the constant consumption of sucrose through drinking stimulates hypothalamic signals of satiety, which would explain the low consumption of solid food. Although there is no clinical evidence to support this assumption, it is possible that the free glucose obtained by the degradation of sucrose is responsible for inducing satiety. Glucose in high concentrations may promote satiety signals in the hypothalamus [39].

Rats that were injected with STZ and supplemented with 10% SSB for a moderate period (7 weeks) exhibited polyphagia. This can be explained that, by means of the compensation mechanism described previously, the capacity of expansion of  $\beta$  cells can be limited in these rats due to the partial damage of pancreatic  $\beta$  cells that was generated at neonatal age. Therefore, this results in a failure to compensate increased metabolic needs [34].

In addition, we found that the consumption of SSB gave rise to an increase in body weight gain in male rats, but not in female rats. Previous studies have reported that high-

carbohydrate diets lead to body weight gain [26, 40]. This is due to the fact that the excess of carbohydrates in the diet is stored in adipose tissue in the form of triglycerides, leading to an increase in the body mass of the individual. To support this, some studies have demonstrated an association between sucrose intake and triglycerides [41].

Contrariwise, male and female rats that were injected with 90 mg of STZ and male rats that received 10% SSB for 7 or 11 weeks in addition to the STZ had a lower body weight gain. Considering that these rats had hyperglycemia, the low body weight gain in diabetes is explained as due to the inability of the cells to use glucose as the main source of energy. Thus, it degrades fatty acids and proteins to maintain the vital functions of the organism [5–7].

In summary, in this research, the following two different and important models were generated in Wistar rats that might be useful in research on diabetes: (a) male and female rats with neonatal STZ (70 mg/kg) have mild insulin resistance and glucose intolerance, and (b) male rats with neonatal STZ plus 10% SSB for 7 weeks developed hyperglycemia, mild insulin resistance, low body weight gain, and polyphagia; therefore, we considered the latter model as a model that is more similar to type 2 diabetes. In addition, we can reproduce a diabetes model with 90 mg/kg of STZ; however, we emphasize that its use in research can be difficult because this dose induces high mortality. The use of each of the two models will depend on the purpose of the study.

In general, these models have the advantage of being inexpensive due to the fact that the STZ is administered at neonatal age; therefore, the amount of this drug employed is minimal compared to when it is used in adult age rats. On the other hand, the use of sweetened beverages with commercial sugar for a short time is cheaper than the use of special solid food (high-fat and high-carbohydrate diets).

### Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

### Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

### Acknowledgments

This work was supported by grant 429417 and projects 269889 and 269696 funded by CONACYT. We also appreciate the technical assistance of Travis Ashworth.

### References

- [1] American Diabetes Association, "2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018," *Diabetes Care*, vol. 41, Supplement 1, pp. S13–S27, 2018.
- [2] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 8th edition, 2017.



- [3] A. J. F. King, "The use of animal models in diabetes research," *British Journal of Pharmacology*, vol. 166, no. 3, pp. 877–894, 2012.
- [4] M. S. Islam, D. Koya, and B. Portha, "Animal models of diabetes and its associated complications," *Journal Diabetes Research*, vol. 2013, p. 1, 2013.
- [5] C. O. Eleazu, K. C. Eleazu, S. Chukwuma, and U. N. Essien, "Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans," *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, vol. 12, no. 1, p. 60, 2013.
- [6] B. L. Furman, "Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats," *Current Protocols in Pharmacology*, vol. 70, no. 1, pp. 5.47.1–5.47.20, 2015.
- [7] N. Takasu, I. Komiya, T. Asawa, Y. Nagasawa, and T. Yamada, "Streptozotocin- and alloxan-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and DNA fragmentation in pancreatic islets: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as mediator for DNA fragmentation," *Diabetes*, vol. 40, no. 9, pp. 1141–1145, 1991.
- [8] H. A. C. Mora, N. D. M. Aragón, and G. L. F. Ospinga, "Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina," *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, vol. 16, no. 3, pp. 311–319, 2008.
- [9] S. Bonner-Weir, D. F. Trent, R. N. Honey, and G. C. Weir, "Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia," *Diabetes*, vol. 30, no. 1, pp. 64–69, 1981.
- [10] P. A. Marathe, R. R. Parekar, S. P. Shinde, and N. N. Rege, "A split dose regimen of streptozotocin to induce diabetes in a neonatal rat model," *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 38, no. 6, pp. 432–433, 2006.
- [11] R. N. Wang, L. Bouwens, and G. Klöppel, "Beta-cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period," *Diabetologia*, vol. 39, no. 5, pp. 548–557, 1996.
- [12] M. Kataoka, Y. Kawamuro, N. Shiraki et al., "Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 430, no. 3, pp. 1103–1108, 2013.
- [13] B. Portha, C. Levacher, L. Picon, and G. Rosselin, "Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period," *Diabetes*, vol. 23, no. 11, pp. 889–895, 1974.
- [14] A. C. de Oliveira, S. Andreotti, T. da S. M. Farias et al., "Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment," *Endocrinology*, vol. 153, no. 5, pp. 2178–2188, 2012.
- [15] M. A. Patil, P. Suryanarayana, U. K. Putcha, M. Srinivas, and G. B. Reddy, "Evaluation of neonatal streptozotocin induced diabetic rat model for the development of cataract," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, 10 pages, 2014.
- [16] L. Rato, M. G. Alves, T. R. Dias, J. E. Cavaco, and P. F. Oliveira, "Testicular metabolic reprogramming in neonatal streptozotocin-induced type 2 diabetic rats impairs glycolytic flux and promotes glycogen synthesis," *Journal Diabetes Research*, vol. 2015, article 973142, pp. 1–13, 2015.
- [17] S. Shirali, S. Zahra Bathaie, and M. Nakhjavani, "Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats," *Phytotherapy Research*, vol. 27, no. 7, pp. 1042–1047, 2013.
- [18] J. Takada, M. A. Machado, S. B. Peres et al., "Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass," *Metabolism*, vol. 56, no. 7, pp. 977–984, 2007.
- [19] S. Baroni, B. A. da Rocha, J. Oliveira de Melo, J. F. Comar, S. M. Caparroz-Assef, and C. A. Bersani-Amado, "Hydroethanolic extract of *Smallanthus sonchifolius* leaves improves hyperglycemia of streptozotocin induced neonatal diabetic rats," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 9, no. 5, pp. 432–436, 2016.
- [20] P. Barragán-Iglesias, V. H. Oidor-Chan, E. Loeza-Alcocer et al., "Evaluation of the neonatal streptozotocin model of diabetes in rats: evidence for a model of neuropathic pain," *Pharmacological Reports*, vol. 70, no. 2, pp. 294–303, 2018.
- [21] L. Bequer, T. Gómez, J. L. Molina, F. López, C. L. Gómez, and S. Clapés, "Inducción de hiperglucemias moderadas en ratas wistar por inoculación neonatal de estreptozotocina. ¿Inyección subcutánea o intraperitoneal?," *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, vol. 51, no. 4, pp. 178–184, 2014.
- [22] A. Junod, A. E. Lambert, W. Stauffacher, and A. E. Renold, "Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 48, no. 11, pp. 2129–2139, 1969.
- [23] B. Thorens, G. C. Weir, J. L. Leahy, H. F. Lodish, and S. Bonner-Weir, "Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 17, pp. 6492–6496, 1990.
- [24] M. Del Toro-Equihua, R. Velasco-Rodríguez, R. López-Ascencio, and C. Vásquez, "Effect of an avocado oil-enhanced diet (*Persea americana*) on sucrose-induced insulin resistance in Wistar rats," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 24, no. 2, pp. 350–357, 2016.
- [25] J. L. Franklin, M. Mirzaei, T. A. Wearne et al., "Quantitative shotgun proteomics reveals extensive changes to the proteome of the orbitofrontal cortex in rats that are hyperactive following withdrawal from a high sugar diet," *Proteomics*, vol. 16, no. 4, pp. 657–673, 2016.
- [26] R. B. Kanarek and R. Marks-Kaufman, "Developmental aspects of sucrose-induced obesity in rats," *Physiology & Behavior*, vol. 23, no. 5, pp. 881–885, 1979.
- [27] A. Lana, F. Rodríguez-Artalejo, and E. Lopez-García, "Consumption of sugar-sweetened beverages is positively related to insulin resistance and higher plasma leptin concentrations in men and nonoverweight women," *The Journal of Nutrition*, vol. 144, no. 7, pp. 1099–1105, 2014.
- [28] A. Duseja, K. K. Thumburu, A. Das et al., "Insulin tolerance test is comparable to homeostasis model assessment for insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease," *Indian Journal of Gastroenterology*, vol. 26, no. 4, pp. 170–173, 2007.
- [29] K. Okita, H. Iwahashi, J. Kozawa et al., "Usefulness of the insulin tolerance test in patients with type 2 diabetes receiving insulin therapy," *Journal of Diabetes Investigation*, vol. 5, no. 3, pp. 305–312, 2014, Epub 2013 Sep 30.
- [30] B. M. Patel, S. Raghunathan, and U. Porwal, "Cardioprotective effects of magnesium valproate in type 2 diabetes mellitus," *European Journal of Pharmacology*, vol. 728, no. 728, pp. 128–134, 2014.
- [31] T. S. Sung, J. H. La, T. M. Kang, T. W. Kim, and I. S. Yang, "Visceral hypersensitivity and altered colonic motility in type

- 2 diabetic rat," *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, vol. 21, no. 4, pp. 581–588, 2015.
- [32] T. Nir, D. A. Melton, and Y. Dor, "Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 9, pp. 2553–2561, 2007.
- [33] F. Thorel, V. Népote, I. Avril et al., "Conversion of adult pancreatic  $\alpha$ -cells to  $\beta$ -cells after extreme  $\beta$ -cell loss," *Nature*, vol. 464, no. 7292, pp. 1149–1154, 2010.
- [34] A. Pick, J. Clark, C. Kubstrup et al., "Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat," *Diabetes*, vol. 47, no. 3, pp. 358–364, 1998.
- [35] M. O.-C. Ivonne, G. Ceballos, R. Medina-Santillan, R. Medina-Navarro, A. M. Guzman-Grenfell, and J. J. Hicks, "Oxidation by reactive oxygen species (ROS) alters the structure of human insulin and decreases the insulin-dependent D-glucose-C14 utilization by human adipose tissue," *Frontiers in Bioscience*, vol. 10, no. 1-3, pp. 3127–3131, 2005.
- [36] S. Tangvarasittichai, "Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus," *World Journal of Diabetes*, vol. 6, no. 3, pp. 456–480, 2015.
- [37] C. Le May, K. Chu, M. Hu et al., "Estrogens protect pancreatic  $\beta$ -cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 24, pp. 9232–9237, 2006.
- [38] E. Riant, A. Waget, H. Cogo, J. F. Arnal, R. Burcelin, and P. Gourdy, "Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice," *Endocrinology*, vol. 150, no. 5, pp. 2109–2117, 2009.
- [39] C. Leloup, C. Magnan, A. Benani et al., "Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing," *Diabetes*, vol. 55, no. 7, pp. 2084–2090, 2006.
- [40] C. Chaumontet, D. Azzout-Marniche, A. Blais et al., "Rats prone to obesity under a high-carbohydrate diet have increased post-meal CCK mRNA expression and characteristics of rats fed a high-glycemic index diet," *Frontiers in Nutrition*, vol. 2, p. 22, 2015.
- [41] R. G. Thompson, J. T. Hayford, and J. A. Hendrix, "Triglyceride concentrations: the disaccharide effect," *Science*, vol. 206, no. 4420, pp. 838–839, 1979.



# **CAPÍTULO II.**

Efecto de los antioxidantes sobre la expresión de moléculas que regulan la conducta alimentaria en ratas diabéticas

1 **Efecto de los antioxidantes sobre la expresión de moléculas que regulan la**  
2 **conducta alimentaria en ratas diabéticas**

3 Martha Isela Barragán-Bonilla<sup>1</sup>, Mónica Ramírez<sup>2</sup>, Juan Miguel Mendoza-Bello<sup>1</sup>, Eduardo  
4 Castañeda-Saucedo<sup>3</sup>, Penélope Aguilera<sup>4</sup>, Mónica Espinoza-Rojo<sup>1</sup>.

5 <sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas,  
6 Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria, Chilpancingo de  
7 los Bravo, Gro., 39090, Mexico

8 <sup>2</sup>CONACYT-Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Javier Méndez Aponte No. 1, Fracc. Servidor  
9 Agrario, Chilpancingo de los Bravo, Gro., 39070, Mexico

10 <sup>3</sup>Laboratorio de Biología Celular Del Cáncer. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad  
11 Autónoma de Guerrero, Guerrero, Mexico.

12 <sup>4</sup>Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel  
13 Velasco Suárez”, Av. Insurgentes Sur 3877, Mexico City, 14269, Mexico.

14 Autor de correspondencia: **[moniespinoza@yahoo.com](mailto:moniespinoza@yahoo.com)**

15

16

17

18

19

20

21

22

## 23 **Resumen**

24 **Introducción.** El neuropéptido Y (NPY) y proopiomelanocortina (POMC) son neuropéptidos  
25 expresados en el núcleo arcuato (Arc) del hipotálamo, y juegan un papel clave en el control de  
26 la ingesta de alimentos, estimulando el apetito o saciedad respectivamente. Arc es una región  
27 que integra señales metabólicas y hormonales desde la periferia como insulina y leptina, y de  
28 esta manera regula la homeostasis de la glucosa. En modelos animales diabéticos, la hiperfagia  
29 está asociada principalmente al incremento en la expresión de NPY y disminución de POMC en  
30 el Arc. En la diabetes, la conducta hiperfágica contribuye a un control glucémico inadecuado,  
31 pero los tratamientos con antioxidantes pueden atenuar alteraciones como ésta. Sin embargo, se  
32 desconoce si el efecto de los antioxidantes está asociado a cambios en la expresión de NPY y  
33 POMC en el Arc.

34  
35 **Objetivo.** Evaluar el efecto de antioxidantes como extracto de ajo envejecido (EAE), resveratrol  
36 (Rsv) y curcumina (Cur) sobre la hiperfagia diabética y determinar si está relacionado a cambios  
37 en la expresión de moléculas que regulan el apetito y marcadores de estrés oxidante en  
38 circulación.

39  
40 **Materiales y métodos.** Ratas macho de la cepa Wistar de 2 días de edad fueron inyectados con  
41 estreptozotocina (70 mg/kg), después del destete, se les proporcionó agua azucarada al 10 %  
42 durante 4 semanas. A la 10<sup>a</sup> semana de edad, la diabetes fue confirmada y se administraron los  
43 tratamientos: metformina (MET; 100 mg/kg), extracto de ajo envejecido (EAE; 200 mg/kg),  
44 resveratrol (Rsv; 2.25 mg/kg); y curcumina (Cur; 50 mg/kg) por vía oral durante 28 días; se  
45 incluyó un grupo con alimentación controlada (PF, pair feed). El consumo de comida y peso  
46 corporal fueron medidos diariamente. La glicemia, tolerancia a la insulina, concentración de  
47 insulina, leptina, y marcadores de estrés oxidante [actividad enzimática de glutatión peroxidasa  
48 (GPx) y glutatión S transferasa (GST); malondialdehído (MDA) y grupos carbonilo] en plasma  
49 fueron evaluados al final de los tratamientos. Así mismo, las ratas fueron perfundidas  
50 transcárdiacamente para obtener el cerebro y detectar NPY y POMC en el Arc mediante  
51 inmunofluorescencia.

52  
53 **Resultados.** Los animales diabéticos presentaron hiperglucemia en ayuno, hiperfagia, ganancia  
54 de peso corporal escasa, resistencia moderada a la insulina, niveles bajos de insulina, estrés  
55 oxidante moderado, aumento en la expresión de NPY y disminución de POMC en el Arc. La  
56 Met y EAE mostraron actividad antihiperglucemiante; Rsv, Cur y PF tuvieron efecto  
57 hipoglucemiante. Sólo la Cur logró atenuar el estrés oxidante. Por otra parte, ningún tratamiento  
58 disminuyó la hiperfagia diabética, a pesar de que el EAE y la Cur promovieron la disminución  
59 de la expresión de NPY.

60  
61 **Conclusión.** Los antioxidantes pueden modular la glicemia, sin embargo, sólo la Cur y el EAE  
62 pueden regular la expresión de NPY sin afectar la conducta hiperfágica. Se sugiere que un  
63 tratamiento crónico con EAE o Cur podría atenuar la hiperfagia diabética en ratas y  
64 probablemente estar relacionado a cambios en la expresión de NPY y POMC en el Arc.

65  
66  
67

68 **Abstract**

69

70 **Introduction.** Neuropeptide Y (NPY) and proopiomelanocortin (POMC) are neuropeptides  
71 expressed in the arcuate nucleus (Arc) of hypothalamus and play a key role in the control of  
72 food intake behavior by stimulating appetite or satiety, respectively. Arc is an area that integrates  
73 metabolic and hormonal signals from the blood circulation such as insulin and leptin, and thus  
74 it regulates the glucose homeostasis. In diabetic models the hyperphagia is associated with  
75 increased NPY and decreased POMC expression level in Arc, mainly. It is known that  
76 hyperphagic behavior contributes to poor glycemic control. On the other hand, in diabetes the  
77 treatments with antioxidants can attenuate or improve several alterations including diabetic  
78 hyperphagia, however, it is not known if that effect is associated to changes in NPY and POMC  
79 expression levels in Arc.

80

81 **Objective.** To evaluate the effect of antioxidants such as aged garlic extract (AGE), resveratrol  
82 (Rsv) and curcumin (Cur) on diabetic hyperphagia and to determine if this is related to changes  
83 in in the expression of molecules that regulate appetite, and markers of oxidative stress in blood  
84 circulation.

85

86 **Materials and methods.** Male Wistar rats two-days-old, were injected with streptozotocin (70  
87 mg/kg bw), after weaning, they were supplemented with 10 % sucrose-sweetened-beverage for  
88 4 weeks. At 10 weeks-of-age, diabetes was confirmed, and we administered the treatments:  
89 metformin [Met (100 mg/kg)], aged garlic extract [AGE (200 mg/kg)], resveratrol [Rsv (2.25  
90 mg/kg)] and curcumin [Cur (50 mg/kg)] for 28 days orally; we included a pair feed group (PF).  
91 Food intake and body weight was measured daily. Blood glucose, insulin tolerance, insulin and  
92 leptin concentration; oxidative stress markers [glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S  
93 tranferase (GST) enzymatic activity, malondialdehyde (MDA) and carbonyl groups] were  
94 evaluated at the end of the treatments. Likewise, the rats were transcardiacally perfused to  
95 obtain brain and detect NPY and POMC in Arc by immunofluorescence.

96

97 **Results.** Diabetic rats had fasting hyperglycemia, hyperphagia, low body weight gain, moderate  
98 insulin resistance, low insulin levels, moderate oxidative stress, increased expression of NPY  
99 and decreased of POMC in Arc. Met and AGE showed antihyperglycemic activity; Rsv, Cur  
100 and PF had hypoglycemic effect. Only the Cur attenuated the oxidative stress. On the other  
101 hand, any treatment induced a decrease in diabetic hyperphagia, however, EAE and Cur  
102 promoted the decrease of NPY expression.

103

104 **Conclusion.** Antioxidants can control glycaemia, however, only curcumin and AGE can  
105 regulate NPY expression without to affect in hyperphagic behavior. We suggest that a chronic  
106 treatment with Cur o AGE could attenuate diabetic hyperphagia in rats and probably it will be  
107 related to changes in NPY and POMC expression in Arc.

108

109

110

## 111 **Introducción**

112 La conducta alimentaria es un proceso regulado a nivel central en el hipotálamo, el cual también  
113 tiene un papel clave en la homeostasis de la glucosa. Se divide en diferentes núcleos como el  
114 arcuato (ARC), el paraventricular (PVN), el ventromedial (VMH), el dorsometrial (DMH), área  
115 lateral (LHA) y el núcleo supraóptico (SON) (1-4).

116 Las proyecciones neuronales desde el ARC hacia las demás áreas del hipotálamo son relevantes  
117 para la generación de una respuesta a los requerimientos energéticos del organismo. En esta  
118 región, se localizan neuropéptidos con acciones anorexigénicas [proopiomelanocortina  
119 (POMC)] y orexigénicas [neuropéptido Y (NPY)], cuya expresión está regulada por señales  
120 periféricas hormonales (insulina y leptina con efecto anorexigénico, grelina con actividad  
121 orexigénica) o nutrientes (glucosa y ácidos grasos) (3,4).

122 La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que representa un problema grave de  
123 salud pública; se caracteriza por hiperglucemia, además de alteraciones en las moléculas que  
124 regulan la ingesta de alimentos y que están relacionadas directamente con la presencia de  
125 hiperfagia (5-9).

126 En modelos experimentales de DM se han podido evidenciar cambios en la expresión de los  
127 neuropéptidos y en la concentración de hormonas que participan en este proceso, tales como  
128 disminución en la expresión de POMC, aumento de NPY, resistencia y/o disminución en la  
129 concentración de insulina y leptina (8-17).

130 Por otra parte, en la DM se presenta estrés oxidante, condición caracterizada por  
131 sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y disminución en la capacidad del  
132 sistema de defensa antioxidante (18-20). Se considera que el estrés oxidante afecta la regulación  
133 del apetito a pesar de que bajo condiciones fisiológicas normales, las EROs pueden tener efectos  
134 anorexigénicos (21-24). De manera exacta, se desconoce cómo el estrés oxidante promueve la  
135 persistencia de la hiperfagia, pero se propone que la región hipotalámica afectada  
136 principalmente por DM es el ARC. Específicamente a las neuronas que expresan POMC, debido  
137 a que las neuronas que expresan NPY tienen en mayor proporción proteínas desacoplates

138 UCP2, las cuales actúan como amortiguadores en la producción de EROs y son menos  
139 susceptibles a daño por estrés oxidante (25, 26).

140 Dado que el hipotálamo tiene un papel importante en el control de la homeostasis de la glucosa,  
141 además de la regulación de la ingesta de alimentos y otras funciones, mantener su integridad  
142 resulta crucial para su correcto funcionamiento. Por lo tanto, conocer las alteraciones en la  
143 conducta alimentaria provocadas por cambios en el estado redox del hipotálamo es  
144 indispensable.

145 Los antioxidantes tienen un papel neuroprotector a una variedad de condiciones  
146 neurodegenerativas experimentales, incluyendo alteraciones neuronales que son producto de la  
147 DM y que están asociadas con el estrés oxidante. El extracto de ajo envejecido (EAE), el  
148 resveratrol (Rsv) y la curcumina (Cur) han sido ampliamente estudiados por sus propiedades  
149 antioxidantes y neuroprotectoras (27-32). Por ello, este estudio pretende averiguar si  
150 antioxidantes exógenos, además de controlar la glucemia, pueden modular la expresión de  
151 moléculas centrales y periféricas involucradas en la regulación de la ingesta de alimentos en  
152 hipotálamo de ratas diabéticas, y a la vez, describir un mecanismo por el cual ejercen estos  
153 efectos.

## 154 **Materiales y métodos**

155 *Animales.* Ratas macho de la cepa Wistar de 2 días de edad, (las ratas destinadas al apareamiento  
156 fueron donadas por el Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía INNN  
157 “Manuel Velasco Suárez”). Estuvieron alojadas en el Bioterio de la Universidad Autónoma de  
158 Guerrero (UAGro) y tuvieron acceso libre a alimento (Dieta comercial estándar de PURINA  
159 Rodent Lab Chow 5001) y agua, durante su estudio se mantuvieron a condiciones constantes de  
160 temperatura, humedad y ciclos de 12h luz y 12h oscuridad. Las ratas fueron cuidadas bajo las  
161 especificaciones que indica la NOM-062-ZOO-1999 y las reglas establecidas por la comisión  
162 de ética del INNN. Aprobación del proyecto: Protocolo 32/17 con No. de oficio:  
163 CICUAL/SO/VI/22617/028/2017 (Anexo 1).

164

165 *Inducción de DM.*

166 La DM fue inducida como previamente se describe por Barragán-Bonilla, *et al.*, 2019 (33).  
167 Brevemente, las ratas de 2 días de edad fueron dejadas en ayuno durante 8 h y se les administró  
168 STZ (de SIGMA-Aldrich; No. Cat. S0130) vía i.p. [70 mg/kg de peso corporal (PC)] recién  
169 preparada, en 25 µl de buffer de citrato de sodio pH 4.5. Fueron destetadas hasta los 21 días de  
170 edad y se les proporcionó agua azucarada al 10 % (Azúcar comercial estándar elaborada de  
171 acuerdo con las especificaciones de la NOM051 SCFI/SSA1/2010) durante 4 semanas. A la 7<sup>a</sup>  
172 semana de edad las ratas fueron separadas en cajas individuales para su adaptación, y a partir de  
173 la 8<sup>a</sup> semana, se realizaron pruebas para determinar la presencia de DM. Aquellos animales que  
174 presentaron hiperglucemia en ayuno e hiperfagia fueron incluidos en el estudio.

175 *Grupos experimentales y programa de tratamiento.* Las ratas fueron clasificadas en 7 grupos de  
176 estudio de manera aleatoria: 1) Ratas control (**C**); 2) Ratas diabéticas (**D**); 3) Ratas diabéticas  
177 tratadas con Metformina (100 mg/kg; **D+Met**); 4) Ratas diabéticas tratadas con EAE (200  
178 mg/kg; **D+EAE**); 5) Ratas diabéticas tratadas con Curcumina (50 mg/kg; **D+Cur**); 6) Ratas  
179 diabéticas tratadas con Resveratrol (2.25 mg/kg; **D+Rsv**) y; 7) Ratas diabéticas con alimentación  
180 controlada [Pair-feed (**D+PF**)]. Cada grupo estuvo conformado por al menos 6 ratas.

181 *Medición del consumo de alimentos:* Se colocó alimento (previamente medido) a las 8:00 am, y  
182 después de 24 h, el alimento fue retirado y medido nuevamente. La cantidad de comida que  
183 consumieron en 24 h se calculó mediante una diferencia, y el resultado fue ajustado al PC (g/100  
184 g de peso corporal/día).

185 *Medición de glucosa en ayuno y curva de tolerancia a la insulina (CTI):* La concentración de  
186 glucosa sanguínea fue evaluada en las ratas de 10 semanas de edad con ayuno de 8 h. Se utilizó  
187 un kit de diagnóstico OneTouch® Ultra™, tomando en cuenta las instrucciones de los  
188 fabricantes. Posteriormente se les administró insulina (0.5 UI/kg i.p.), y se monitorearon las  
189 concentraciones de glucosa a los 30, 60 y 120 min posteriores a la administración de insulina.

190 *Medición de concentración de insulina y leptina.* Las muestras sanguíneas fueron obtenidas  
191 después de 28 días de tratamiento, al momento del sacrificio de las ratas con previo ayuno de 8  
192 h mediante punción cardiaca. La concentración de insulina y leptina fue medida usando kits de

193 ELISA (Insulina No. de Cat. RAB0904 de SIGMA-Aldrich; Leptina No. de Cat. RD191001100  
194 de BioVendor) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

195 *Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px)*. Las muestras fueron incubadas en una solución  
196 redox (50 mM buffer de fosfatos pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM azida de sodio, 0.2 mM NADPH,  
197 1 U/ml glutatión reductasa y 1 mM glutatión reducido) y se incubó durante 5 minutos a 37°C.  
198 La reacción se inició agregando 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se empleó el coeficiente de absorción milimolar  
199 del NADPH a 340 nm (6.22x10<sup>6</sup>) para cuantificar la actividad. Los resultados se ajustan por mg  
200 de proteína y se expresan como U/mg de proteína, donde U=μmoles de NADPH  
201 oxidado/minuto.

202 *Actividad de glutatión S transferasa (GST)*. Las muestras fueron incubadas con 100 mM 1-  
203 cloro-2,4-dinitroclorobenceno (CDNB) y GSH reducido 100 mM como sustratos en 0.1M buffer  
204 de fosfato de potasio pH 6.5 a 30°C. La reacción catalizada por GST, forma un conjugado cuya  
205 absorbancia fue evaluada a 340 nm

206 *Concentración de Malondialdehído*. La peroxidación lipídica fue estimada midiendo  
207 malondialdehído (MDA) plasmático, las determinaciones colorimétricas de MDA usaron 1-  
208 metil-2-fenilindol en un ensayo basado en HCl y los valores fueron calculados a partir de una  
209 curva estándar usando 1,1,3,3 tetrametoxipropano (34).

210 *Concentración de grupos carbonilos*. El daño a proteínas fue evaluado por el contenido de  
211 grupos carbonilos, el cual fue determinado mediante la derivatización de 2,4-  
212 dinitrofenilhidrazina (DNPH). Las muestras de plasma fueron incubadas en presencia de 10  
213 mM/l de DNPH en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 h. Las proteínas fueron  
214 precipitadas con ácido tricloroacético al 5 % y 2.5 % (peso/volumen) y centrifugadas a 3500  
215 rpm por 10 min. Los pellets fueron lavados con etanol/acetato de etilo (1:1; volumen/volumen)  
216 y resuspendidos en 6 M/l hidrocloreuro de guanina a 37°C por 10 min. El nivel de proteínas  
217 carboniladas fue cuantificado por espectrofotometría a 370 nm usando un coeficiente de  
218 extinción de 22,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

219 *Sacrificio y obtención del cerebro*. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (65  
220 mg/kg i.p.) (Cheminova) y posteriormente perfundidas transcárdiacamente con heparina diluida



221 en buffer de fosfatos 0.1 pH 7.4 frío, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4 % frío (de SIGMA  
222 Aldrich; No. de Cat. P6148). Los cerebros fueron extraídos, post-fijados en PFA al 4 %, y  
223 deshidratados en buffer con sacarosa al 15 % y al 30 % a 4°C. Posteriormente, fueron congelados  
224 en una solución que contiene polietilenglicol (Tissue-Tek O.C.T. Compound de SAKURA; No.  
225 de Cat. 4583) y fueron cortados en secciones coronales de 35 µm en un criostato (Leica) y  
226 almacenados en una solución crioprotectora -20°C hasta su uso (34).

227 *Detección de NPY y POMC por inmunofluorescencia.* Las secciones de tejido fueron lavadas  
228 con buffer PBS 0.1M pH 7.4m, posteriormente se añadió una solución de bloqueo (BSA al 5 %,  
229 suero de normal de cabra al 2 % y Tritón al 0.3 %). Los anticuerpos primarios fueron dejados  
230 durante toda la noche a 4°C (anti-NPY Rabbit monoclonal, No. de Cat. 11976 de Cell Signaling;  
231 anti-POMC Mouse monoclonal, No. de Cat. ab73092 de Abcam). Los anticuerpos secundarios  
232 fueron incubados en las muestras durante 2 h (Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-  
233 Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 No. de Cat. A10037; Goat anti-Rabbit IgG  
234 (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 No. de Cat. A-11034 de  
235 Invitrogen). Luego se montaron en DABCO y las fotomicrografías fueron capturadas con una  
236 cámara digital AxioCam (Carl Zeiss), montada sobre un microscopio Zeiss (AxioVision).

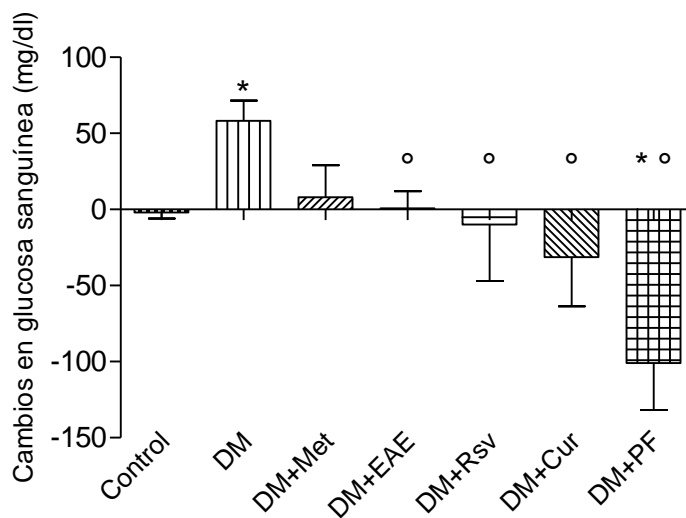
237 *Análisis de datos.* Los datos fueron expresados como media ± EE. La variación entre grupos fue  
238 medida por un análisis de varianza de una vía o de dos vías (ANOVA) seguida por la prueba de  
239 Bonferroni. El análisis estadístico se realizará usando el Software Graphad Prism v5.0. La  
240 significancia estadística fue considerada cuando el valor de  $p < 0.05$ .

## 241 **Resultados**

### 242 *Efecto de los antioxidantes sobre la glicemia en animales diabéticos*

243 La administración de STZ (70 mg/kg) al 2º día de edad de las ratas y la ingesta de agua azucarada  
244 al 10% durante un mes, promovió un incremento en la concentración de glucosa sanguínea en  
245 ayuno superior a 200 mg/dl cuando los animales alcanzaron la edad adulta (Datos no mostrados).  
246 En la figura 1, se muestran los cambios en la concentración de glucosa sanguínea después de  
247 los tratamientos administrados durante 28 días por vía oral. La concentración de glucosa  
248 sanguínea en el grupo DM tuvo un incremento de 58 mg/dl en comparación con el grupo Control

249 (p<0.05). La administración de Met y EAE evitaron el aumento en la glicemia, mientras que el  
 250 tratamiento con Rsv, Cur y la alimentación controlada provocaron una disminución en la  
 251 glicemia de 10, 31 y 101 mg/dl respectivamente en comparación con el grupo DM (p<0.05).

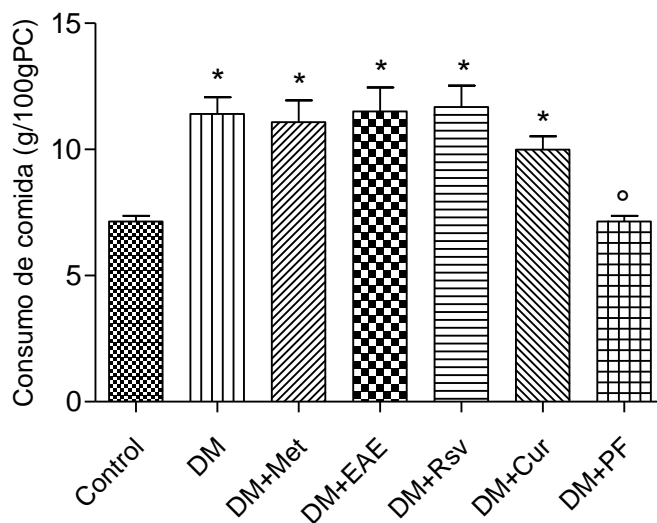


252 **Figura 1. Efecto de los antioxidantes sobre el nivel de glucosa sanguínea en ratas diabéticas.** Se  
 253 muestra el cambio en los niveles de glucosa sanguínea (mg/dl) en grupos control y experimentales  
 254 (diabéticas inducidas con 70 mg de STZ por kg de PC al 2º día de edad y consumo de agua azucarada al  
 255 10 % durante 4 semanas) después de 28 días de tratamiento con metformina (DM+Met), EAE  
 256 (DM+EAE), Rsv (DM+Rsv), curcumina (DM+Cur) o alimentación controlada (DM+PF). Los datos son  
 257 representados como media±EE. Para calcular la significancia estadística se empleó una prueba de  
 258 varianza de una vía (ANOVA) seguido de Bonferoni. \*p < 0.05 vs control y °p < 0.05 vs DM.  
 259

### 260 *Efecto de los antioxidantes sobre la ingesta de alimentos*

261 Para demostrar si los antioxidantes regulan el consumo de alimentos, se monitoreó la cantidad  
 262 de comida consumida diariamente, se calculó el promedio y fue ajustado al peso corporal de las  
 263 ratas. Los animales del grupo control consumieron en promedio 7 g de comida por cada 100 g  
 264 de peso corporal por día, mientras que los animales diabéticos sin tratamiento y con Met, EAE  
 265 y Rsv consumieron 11 g/100 g PC/día, es decir, 4 gramos más que el grupo control (p<0.05 vs  
 266 Control); y el grupo diabético tratado con Cur consumió 10 g en promedio (p<0.05 vs Control)  
 267 (Figura 2).

268 Estos resultados indican que los tratamientos son incapaces de regular la hiperfagia diabética a  
 269 pesar de que la Cur muestra una tendencia a controlar esa condición, sin cambios  
 270 estadísticamente significativos en comparación con el grupo diabético.

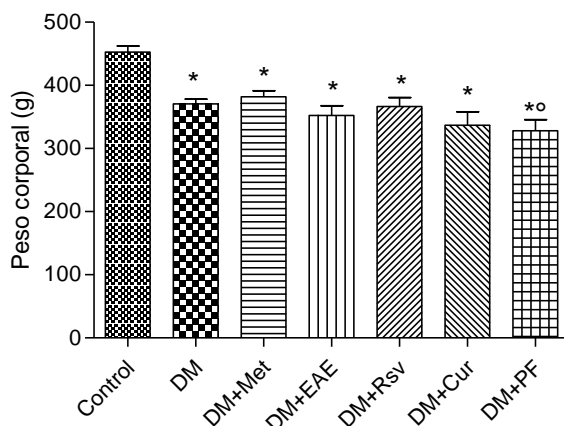


271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280

**Figura 2. Efecto de los antioxidantes sobre el consumo de alimentos.** Se muestra el consumo de alimentos diario ajustado al peso corporal (g/100g de peso corporal/día) en grupos control y experimentales (diabéticas inducidas con 70 mg de STZ por kg de PC al 2º día de edad y consumo de agua azucarada al 10 % durante 4 semanas) después de 28 días de tratamiento con metformina (DM+Met), EAE (DM+EAE), Rsv (DM+Rsv), curcumina (DM+Cur) o alimentación controlada (DM+PF). Los datos son representados como media±EE. Para calcular la significancia estadística se empleó una prueba de varianza de una vía (ANOVA) seguido de Bonferroni. \*p <0.05 vs control y °p <0.05 vs DM).

281 *Efecto de los antioxidantes sobre el peso corporal*

282 Para determinar el efecto de los antioxidantes sobre el peso corporal de los animales diabéticos,  
283 este parámetro fue monitoreado diariamente y se calculó el promedio del peso corporal de las  
284 últimas dos semanas del esquema de los tratamientos. En la figura 3, se muestra que los grupos  
285 diabéticos tuvieron un peso corporal menor en comparación con el grupo control (p<0.05).  
286 Ningún tratamiento indujo el aumento en el peso corporal.



287 **Figura 3. Efecto de los antioxidantes sobre el peso corporal (g).** Se muestran los cambios en el peso  
 288 corporal (g) de grupos control y experimentales (diabéticas inducidas con 70 mg de STZ por kg de PC  
 289 al 2° día de edad y consumo de agua azucarada al 10 % durante 4 semanas) después de 28 días de  
 291 tratamiento con metformina (DM+Met), EAE (DM+EAE), Rsv (DM+Rsv), curcumina (DM+Cur) o  
 292 alimentación controlada (DM+PF). Los datos son representados como media±EE. Para calcular la  
 293 significancia estadística se empleó una prueba de varianza de una vía (ANOVA) seguido de Bonferroni.  
 294 \*p <0.05 vs control y °p <0.05 vs DM).

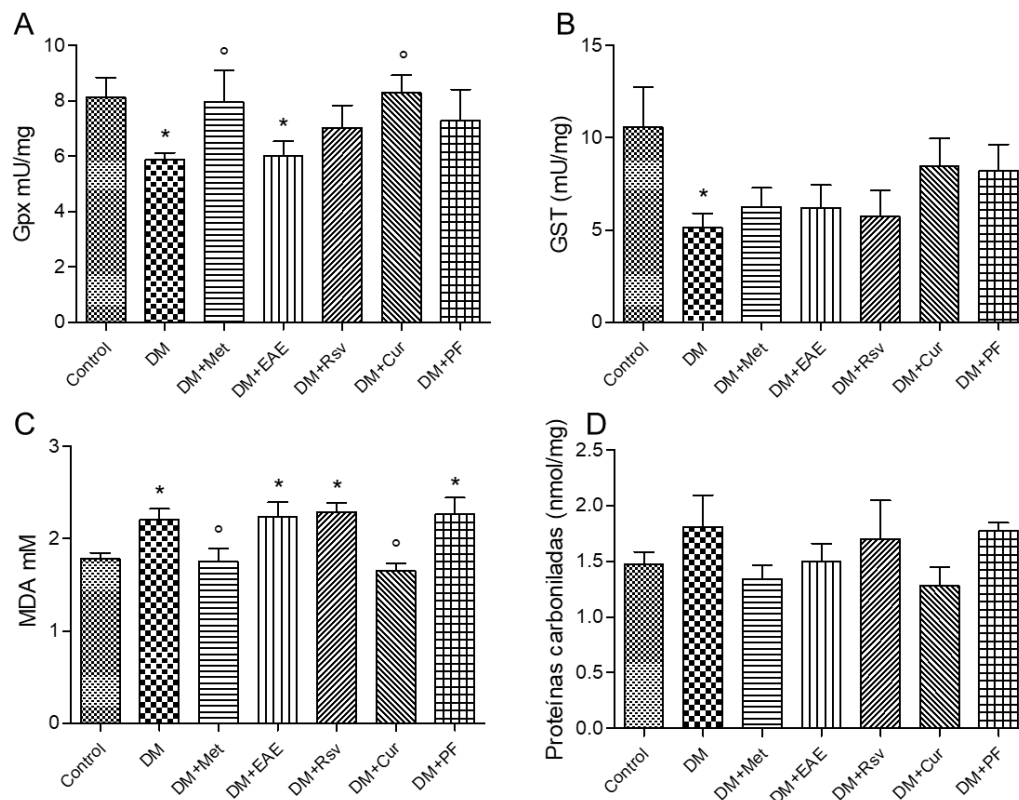
295 *Efecto de los antioxidantes sobre marcadores de estrés oxidante en plasma de animales*  
 296 *diabéticos*

297 Con el fin de evaluar el estrés oxidante en el organismo de animales diabéticos y determinar el  
 298 efecto de los antioxidantes, se midieron marcadores de estrés oxidante en plasma de los grupos  
 299 de estudio. Las enzimas GPx y GST fueron utilizadas para conocer la capacidad del sistema  
 300 endógeno de defensa antioxidante, mientras que el MDA y los grupos carbonilos fueron  
 301 empleados como marcadores de daño a lípidos y proteínas, respectivamente.

302 Con relación a las enzimas antioxidantes endógenas como GPx y GST (Figura 4A y 4B), el  
 303 grupo DM mostró una disminución significativa de la actividad de GPx y de GST (p<0.05 vs  
 304 Control). Los tratamientos con Met o Cur reestablecieron la actividad enzimática de GPx  
 305 (p<0.05 vs DM); mientras que en el caso de GST, sólo la Cur o alimentación controlada  
 306 muestran una tendencia a aumentar la actividad de esta enzima sin cambios estadísticamente  
 307 significativos.

308 Respecto a los marcadores de daño oxidante, en el grupo DM se observó que el nivel de MDA  
 309 incrementó significativamente (p<0.05 vs Control), mientras que el nivel de grupos carbonilos  
 310 mostraron una tendencia a aumentar en comparación con el grupo Control. Los tratamientos con

311 Met y Cur disminuyeron de manera importante la concentración de MDA en comparación con  
 312 el grupo DM sin tratamiento ( $p < 0.05$  vs DM) (Figura 4C y 4D).



313

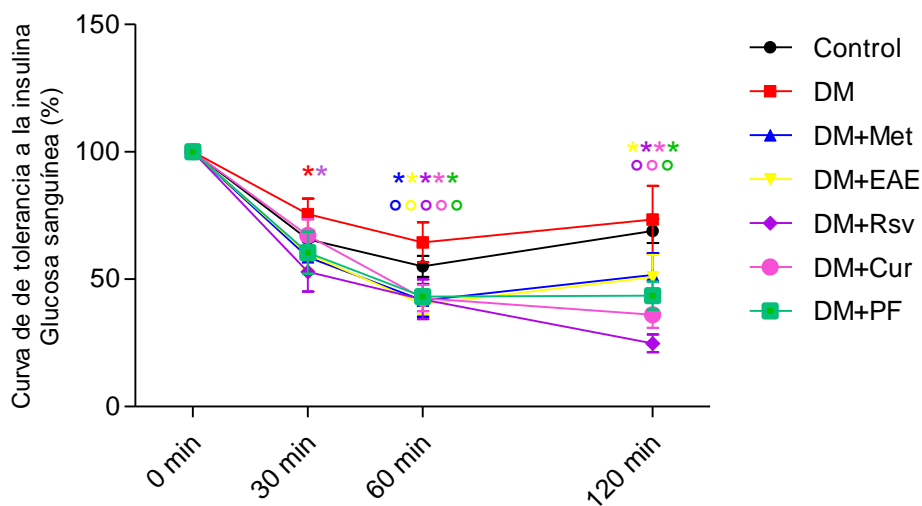
314 **Figura 4. Efecto de los antioxidantes sobre marcadores de estrés oxidante en muestras.** Se muestran  
 315 los valores obtenidos de cada uno de los marcadores de estrés oxidante (actividad enzimática de GPx y  
 316 GST, nivel de MDA y proteínas carboniladas) determinados en plasma de grupos control y  
 317 experimentales en grupos control y experimentales (diabéticas inducidas con 70 mg de STZ por kg de  
 318 PC al 2° día de edad y consumo de agua azucarada al 10 % durante 4 semanas) después de 28 días de  
 319 tratamiento con metformina (DM+Met), EAE (DM+EAE), Rsv (DM+Rsv), curcumina (DM+Cur) o  
 320 alimentación controlada (DM+PF). Los datos son representados como media±EE. Para calcular la  
 321 significancia estadística se empleó una prueba de varianza de una vía (ANOVA) seguido de Bonferroni.  
 322 \* $p < 0.05$  vs control y <sup>o</sup> $p < 0.05$  vs DM).

323

324 *Efecto de los antioxidantes sobre la sensibilidad a la insulina y sobre la concentración de*  
 325 *insulina y leptina plasmática de animales diabéticos.*

326 Con el fin de demostrar si los antioxidantes tienen efecto sobre hormonas circulantes que regulan  
 327 la saciedad como insulina y leptina, se evaluó la sensibilidad a la insulina exógena en función  
 328 de los cambios de glucosa en un tiempo de 2 h. También se midió el nivel de insulina y leptina  
 329 en plasma de los diferentes grupos de estudio después de 28 días de tratamiento.

330 En relación a la tolerancia a la insulina (Figura 5), observamos que el grupo de animales  
 331 diabéticos tuvieron una respuesta disminuida a la insulina administrada de manera exógena.  
 332 Observamos que cualquiera de los tratamientos mejoró la sensibilidad a la insulina en  
 333 comparación con el grupo diabético ( $p < 0.05$  vs DM).



334

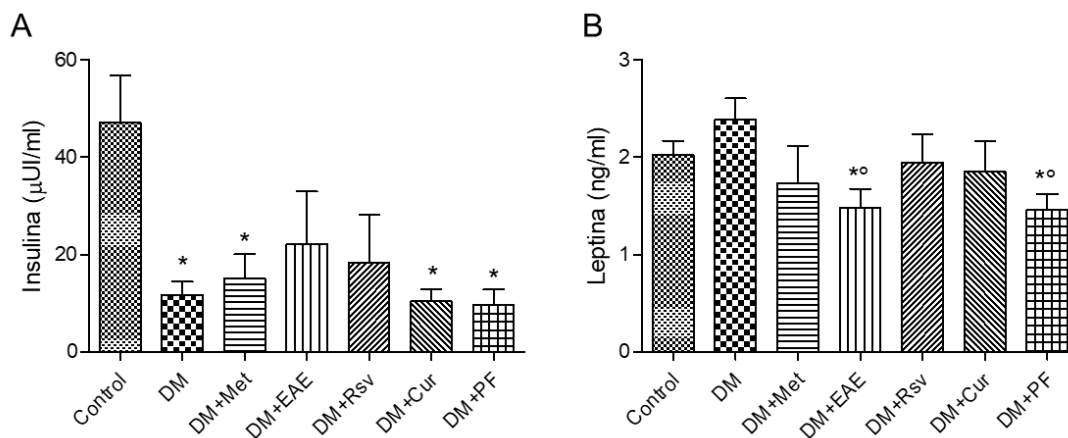
335 **Figura 5. Efecto de los antioxidantes sobre la sensibilidad a la insulina.** Se muestran los cambios en  
 336 la concentración de glucosa en función del tiempo, después de administrar insulina [0 min (0.5 UI/kg)]  
 337 vía i.p. en grupos control y experimentales (diabéticas inducidas con 70 mg de STZ por kg de peso  
 338 corporal al 2° día de edad y consumo de agua azucarada al 10 % durante 4 semanas) después de 28 días  
 339 de tratamiento con metformina (DM+Met), EAE (DM+EAE), Rsv (DM+Rsv), curcumina (DM+Cur) o  
 340 alimentación controlada (DM+PF). El nivel de glucosa inicial fue ajustado al 100% y los datos son  
 341 presentados como media±EE. Para calcular la significancia estadística se empleó una prueba de varianza  
 342 de dos vías (ANOVA) seguido de Bonferroni. \* $p < 0.05$  vs control y  $^{\circ}p < 0.05$  vs DM)

343 Con respecto a la concentración de insulina, encontramos que en el grupo de animales diabéticos  
 344 (grupo DM), el nivel de esta hormona disminuyó significativamente hasta en un 60 % en  
 345 comparación con el grupo control ( $p < 0.05$  vs Control). Los grupos de animales diabéticos  
 346 tratados con Met, Cur o con alimentación controlada, no mostraron cambios en la concentración  
 347 de insulina plasmática en comparación con los animales diabéticos; sin embargo, con los  
 348 tratamientos de EAE y Rsv se observó una tendencia a incrementar la concentración de insulina  
 349 (Figura 6A)

350 Al evaluar el efecto de los tratamientos sobre la concentración de leptina (Figura 6B),  
 351 observamos que en el grupo DM hay una tendencia a incrementar sin cambios estadísticamente

352 significativos. En los grupos tratados con Met, Rsv o Cur se encontró una concentración de  
 353 leptina cercana al grupo control. En contraste, el tratamiento con EAE o la alimentación  
 354 controlada, produjeron una disminución del 30 % en la concentración de leptina plasmática con  
 355 respecto al grupo DM ( $p < 0.05$ ).

356



357

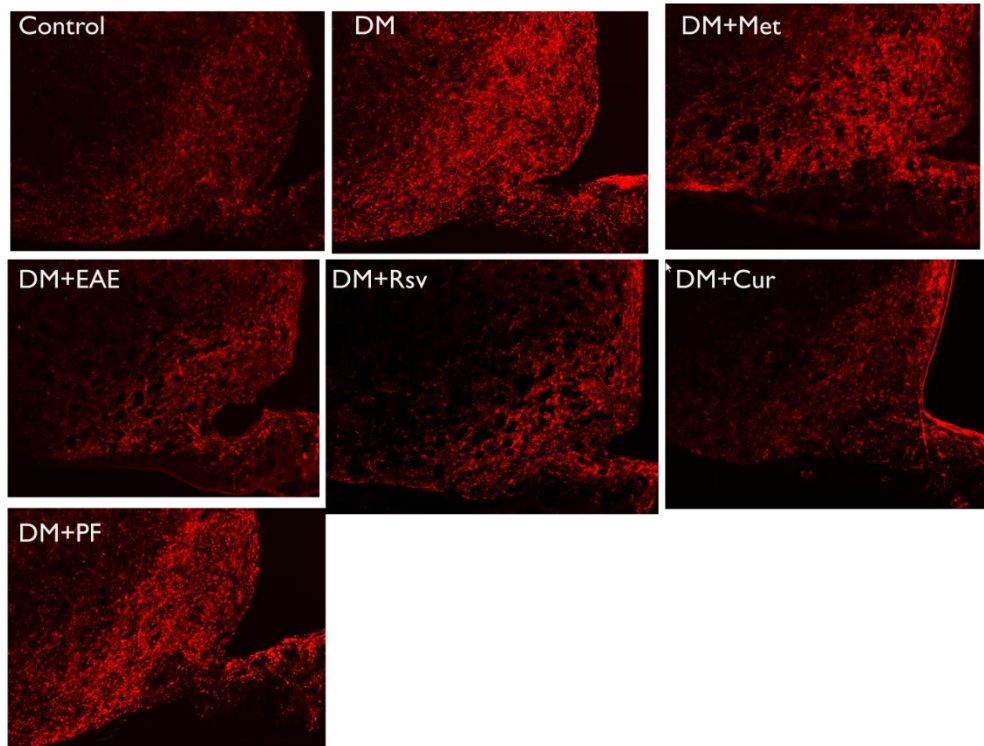
358 **Figura 6. Efecto de los antioxidantes sobre la concentración de insulina y leptina plasmática de**  
 359 **grupos control y experimentales (diabéticas inducidas con 70 mg de STZ por kg de PC al 2° día de edad**  
 360 **y consumo de agua azucarada al 10 % durante 4 semanas) después de 28 días de tratamiento con**  
 361 **metformina (DM+Met), EAE (DM+EAE), Rsv (DM+Rsv), curcumina (DM+Cur) o alimentación**  
 362 **controlada (DM+PF). Los datos son representados como media±EE. Para calcular la significancia**  
 363 **estadística se empleó una prueba de varianza de una vía (ANOVA) seguido de Bonferroni. \*p < 0.05 vs**  
 364 **control y °p < 0.05 vs DM).**

365 *Efecto de los antioxidantes sobre la expresión de NPY y POMC en el núcleo arcuato del*  
 366 *hipotálamo de animales diabéticos.*

367 Con el fin de demostrar cambios en la expresión de neuropéptidos centrales en el núcleo arcuato  
 368 del hipotálamo de animales diabéticos en respuesta a los tratamientos con los antioxidantes, se  
 369 midió la expresión del NPY y POMC mediante inmunofluorescencia en secciones de cerebro  
 370 de las ratas de los diferentes grupos de estudio.

371 En el grupo de animales diabéticos, observamos un aumento en la expresión del NPY y la  
 372 disminución de POMC ( $p < 0.05$ , vs grupo Control) (Figura 7 y 8). Los grupos con tratamiento  
 373 de Met, Rsv o alimentación controlada, mostraron un nivel aumentado del NPY ( $p < 0.05$ , vs  
 374 grupo Control), similar al grupo diabético. Por el contrario, la administración de EAE y de Cur,

375 provocaron una disminución significativa en la expresión de este neuropéptido ( $p < 0.05$  vs grupo  
376 D). Con relación a la expresión de POMC, encontramos que ningún tratamiento modificó la  
377 expresión de éste, sin embargo, los grupos tratados con Met o Cur muestran una tendencia a  
378 restaurar el nivel de expresión de POMC, similar que en el grupo control (Figura 7 y 8).



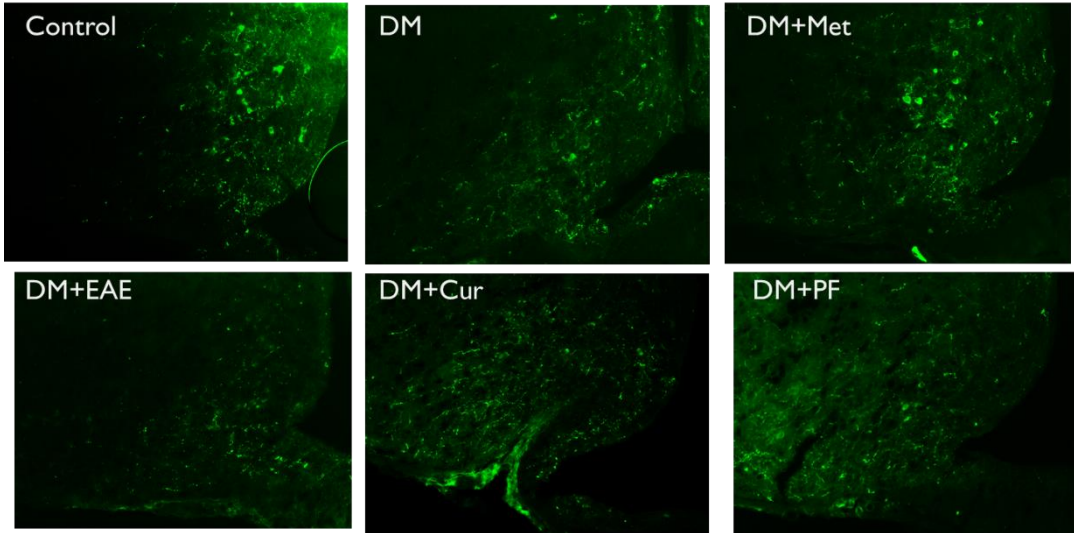
379

380

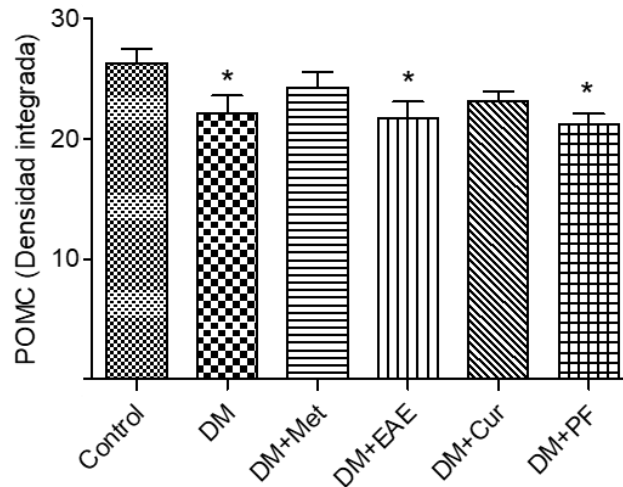
381 **Figura 7. Expresión de NPY en el ARC de animales diabéticos.** A) Se muestran las fotomicrografías  
382 de NPY (1:2000) en el núcleo arcuato hipotálamo, como anticuerpo secundario se empleó Alexa anti-  
383 rabbit 568 (1:500). Las muestras corresponden a secciones de hipotálamo de los distintos grupos de  
384 estudio (Control = grupo control; DM = grupo diabético; DM+Met=grupo diabético con tratamiento de



385 metformina; DM+EAE = grupo diabético con tratamiento de extracto de ajo envejecido; DM+Rsv =  
 386 grupo diabético con tratamiento de resveratrol; DM+Cur = grupo diabético con tratamiento de Cur;  
 387 DM+PF = grupo diabético con alimentación controlada). B) Análisis densitométrico de la intensidad de  
 388 fluorescencia para NPY en los distintos grupos de estudio, se utilizó el software de AxioVision Rel2.  
 389 Los datos son representados como media±EE. Para calcular la significancia estadística se empleó una  
 390 prueba de varianza de una vía (ANOVA) seguido de Bonferroni. \*p <0.05 vs control y °p <0.05 vs DM).



391



392 A) Se muestran las fotomicrografías de POMC (1:400) en el núcleo arcuato hipotálamo, como anticuerpo  
 393 secundario se empleó Alexa anti-mouse 488 (1:500). Las muestras corresponden a secciones de  
 394 hipotálamo de los distintos grupos de estudio (Control = grupo control; DM = grupo diabético;  
 395 DM+Met=grupo diabético con tratamiento de metformina; DM+EAE = grupo diabético con tratamiento  
 396 de extracto de ajo envejecido; DM+Rsv = grupo diabético con tratamiento de resveratrol; DM+Cur =  
 397 grupo diabético con tratamiento de Cur; DM+PF = grupo diabético con alimentación controlada). B)  
 398 Análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia para NPY en los distintos grupos de estudio,  
 399 se utilizó el software de AxioVision Rel2. Los datos son representados como media±EE. Para calcular  
 400 la significancia estadística se empleó una prueba de varianza de una vía (ANOVA) seguido de  
 401 Bonferroni. \*p <0.05 vs control y °p <0.05 vs DM).

403

## 404 **Discusión**

405 El modelo de diabetes mellitus empleado en esta investigación (2nSTZ 70mg + Agua azucarada  
406 al 10 %) presentó hiperglucemia crónica, un estrés oxidante en circulación (actividad enzimática  
407 disminuida de GPx y GST, y aumento en el nivel de MDA), hiperfagia, sensibilidad disminuida  
408 a la insulina, concentración baja de insulina y elevada de leptina en plasma, así como expresión  
409 aumentada de NPY y disminuida de POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo.

410 La hiperglucemia crónica es explicada en parte, debido a que la inyección de STZ en edad  
411 neonatal aunado a la ingesta de agua azucarada, induce destrucción parcial de las células  $\beta$  del  
412 páncreas. Además, en conjunto con la administración de agua azucarada, promueven a una  
413 disminución en la producción y secreción de insulina en ratas de edad adulta (35-38). Estos  
414 resultados concuerdan con la disminución en la concentración de insulina plasmática.

415 El tratamiento con metformina mostró un efecto anti-hiperglucemiante. Previamente se ha  
416 descrito que su mecanismo de acción consiste en la estimulación de AMPK en tejidos periféricos  
417 como músculo, tejido adiposo e hígado. AMPK es una cinasa que promueve el anclaje del  
418 transportador de glucosa GLUT4 a la membrana celular para permitir la entrada de la glucosa  
419 hacia la célula. En hígado, AMPK activo, induce la disminución en la producción de glucosa  
420 hepática; en conjunto, esto conlleva una disminución de la concentración de glucosa en el  
421 torrente sanguíneo. Su efecto hipoglucemiante demostrado en otros estudios (39-41), puede  
422 verse limitado por la presencia de estrés oxidante. Dolinsky y col., (2014) demostraron que la  
423 actividad de AMPK es afectada por 4-Hidroxinonenal (4-HNE), un producto derivado de la  
424 peroxidación lipídica (42). En concordancia, encontramos aumento en la concentración de  
425 MDA, otro de los productos generados durante la peroxidación lipídica. En futuros estudios,  
426 será determinante evaluar la activación de AMPK en respuesta al tratamiento con metformina  
427 en nuestro modelo de estudio.

428 El EAE también mostró un efecto antihiperglucemiante en dosis de 200 mg/kg por vía oral. En  
429 nuestro grupo de trabajo, previamente habíamos encontrado este efecto en un modelo de DM  
430 inducido mediante la administración únicamente de STZ (60 mg/kg) en edad adulta (43). Se  
431 sugiere que parte de su mecanismo es a través de la modificación en la expresión de

432 transportadores de glucosa como GLUT2 en hígado, GLUT1 y GLUT4 en músculo, GLUT1,  
433 GLUT3 y GLUT4 en cerebro (43-46).

434 En cuanto al resveratrol y la curcumina, que tuvieron actividad hipoglucemiante, se ha  
435 evidenciado en otros estudios, que compuestos con capacidad antioxidante pueden proteger a  
436 las células del estrés oxidante y con esto, evitar la muerte celular (47-49). Las células  $\beta$  del  
437 páncreas tienen una baja capacidad antioxidante, lo que las hace susceptibles a daño por estrés  
438 oxidante, consecuentemente a muerte celular y por lo tanto, producción baja o nula de insulina  
439 (50). En diferentes modelos experimentales de DM, el EAE o su componente principal (S-  
440 alilcisteína), resveratrol y curcumina promueven el aumento en la concentración de insulina  
441 plasmática (49, 51-53). En nuestro estudio, el nivel de insulina en plasma de animales diabéticos  
442 tratados, es inferior al grupo control, pero ligeramente incrementado en los grupos que  
443 recibieron EAE o resveratrol con respecto al grupo de DM, esto refleja posiblemente que ambos  
444 tratamientos podrían prevenir parcialmente la muerte de las células  $\beta$ ; sin embargo, será crucial  
445 evaluar su papel protector sobre estas células.

446 Otro mecanismo propuesto para el control de la glucosa sanguínea es a través del aumento en la  
447 sensibilidad a la insulina. En condiciones fisiológicas normales, la unión de insulina a su  
448 receptor en las células del músculo y tejido adiposo promueve la fosforilación del receptor de  
449 insulina en residuos de tirosina, esto activa la vía de señalización PI3k/Akt y se estimula el  
450 anclaje del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana para el ingreso de la glucosa al  
451 interior de la célula (54). Durante la DM, el estrés oxidante afecta la cascada de señalización de  
452 la insulina a causa de la fosforilación en residuos de serina del receptor de la insulina (55). La  
453 sensibilidad baja a la insulina en el grupo de animales diabéticos se evidenció mediante una  
454 prueba de tolerancia a la insulina, en la que se mide la respuesta a esta hormona cuando es  
455 administrada de manera exógena.

456 La acción antioxidante de los tratamientos evaluados es importante para evitar la activación de  
457 las vías de señalización sensibles al estrés. En nuestro estudio, los animales diabéticos con  
458 tratamientos favorecen una mayor sensibilidad a la insulina. En el caso del EAE, nuestro grupo  
459 de trabajo ha mostrado que, en animales diabéticos, estimula una mayor fosforilación en  
460 residuos de tirosina del receptor de insulina en el músculo (56).

461 Adicionalmente, Corichi *et al.*, (2012) encontraron que en pacientes diabéticos, las EROs  
462 pueden oxidar a la insulina cuando es administrada de manera exógena (57), esto explicaría en  
463 parte la baja respuesta a la insulina que los animales diabéticos tuvieron en la prueba de  
464 tolerancia a la insulina. Por lo tanto, el uso de antioxidantes como tratamiento durante la  
465 diabetes, es importante para mantener la integridad de macromoléculas.

466 Con relación a la hiperfagia, se trata de una conducta característica de la DM y está relacionada  
467 directamente con el aumento en la expresión de NPY y disminución de POMC en el núcleo  
468 arcuato del hipotálamo (8, 10, 11, 15, 17). La expresión de estos neuropéptidos está regulada en  
469 gran medida por la acción de hormonas circulantes que participan en control del apetito y  
470 saciedad, como insulina, leptina y grelina, y la función de éstas, se encuentra determinada por  
471 su expresión y secreción al torrente sanguíneo, además de la correcta funcionalidad de sus  
472 receptores en el tejido hipotalámico (9, 11-14).

473 En la presente investigación, la conducta hiperfágica que presentaron los animales diabéticos es  
474 explicada por el aumento en la expresión de NPY y disminución de POMC en el núcleo arcuato.  
475 A su vez, los cambios en la expresión de los neuropéptidos, es debida en parte, a la disminución  
476 en la sensibilidad y concentración de insulina, que a nivel central, inhibe el apetito (13). La  
477 leptina es otra de las hormonas importantes que disminuyen el apetito (14). En nuestro estudio,  
478 encontramos que el nivel de leptina se encuentra ligeramente incrementado. Bajo condiciones  
479 fisiológicas normales, el aumento en la concentración de leptina plasmática explicaría un  
480 aumento en la saciedad. Sin embargo, los animales presentan hiperfagia; esto puede ser debido  
481 a que a pesar de que existan niveles incrementados de leptina, la presencia de resistencia a esta  
482 hormona impida que lleve a cabo su efecto orexigénico (58). El estrés oxidante juega un papel  
483 clave en este proceso, pues se ha descrito que también afecta la señalización normal de la leptina  
484 (58), probablemente, por esa razón, el nivel de NPY se encuentra incrementado y el de POMC  
485 está disminuido a pesar de los niveles ligeramente elevados de leptina.

486 La administración de metformina o antioxidantes no tuvo un efecto importante sobre la  
487 hiperfagia diabética, como previamente se ha demostrado en otros estudios (59). Únicamente,  
488 la curcumina mostró una tendencia a atenuar esta condición, sin embargo, los cambios no son  
489 importantes en términos estadísticos. Adicionalmente, el EAE y la curcumina lograron

490 disminuir la expresión de NPY en el núcleo arcuato del hipotálamo, aunque el nivel de POMC,  
491 en el caso del grupo con EAE, fue similar al grupo diabético sin tratamiento; y cuando recibieron  
492 curcumina, el nivel de POMC se muestra similar al grupo sin diabetes. Estos hallazgos,  
493 demuestran el posible papel del EAE y la curcumina en promover la disminución de la  
494 hiperfagia diabética.

495 Debido a que los animales diabéticos con cualquiera de los tratamientos tienen una persistencia  
496 de la hiperfagia diabética, a pesar de la disminución del NPY en el hipotálamo, parece que es  
497 necesario el aumento importante en la expresión de POMC para inducir la disminución de la  
498 hiperfagia. Además, la inducción de la saciedad no sólo depende de hormonas como leptina e  
499 insulina, y neuropéptidos como NPY y POMC, sino que existen una variedad de moléculas que  
500 intervienen en esta regulación y que ejercen su efecto sobre otros núcleos dentro y fuera del  
501 hipotálamo (1-4). Así mismo, la integridad de las poblaciones neuronales de segundo orden es  
502 crucial para llevar a cabo una neurotransmisión de señales adecuadas. Numerosos reportes  
503 indican que el estrés oxidante en zonas específicas del hipotálamo puede favorecer a la  
504 persistencia de hiperfagia (60).

505 En este estudio, también se evaluó el estrés oxidante a nivel sistémico y se encontró que los  
506 animales diabéticos tienen estrés oxidante. La curcumina fue el antioxidante exógeno que  
507 mostró mayor potencial para disminuir el estrés oxidante al favorecer el aumento en la actividad  
508 de las enzimas GPx y GST y disminución en la concentración de MDA. Las investigaciones  
509 demuestran que los antioxidantes exógenos pueden estimular la expresión de las enzimas  
510 antioxidantes a través de la activación del factor de transcripción Nrf2, proteína que se une a  
511 elementos de respuesta a antioxidantes (ARE, *antioxidant response element*) que se encuentran  
512 en los promotores de las enzimas antioxidantes (63,64). Aunado a su capacidad para incrementar  
513 el sistema de defensa antioxidante, la disminución en el nivel de MDA puede deberse a que la  
514 curcumina es un componente que puede anclarse a las membranas celulares y de esta manera,  
515 protegerlas de la peroxidación lipídica (65).

516 Aunque se encontró estrés oxidante moderado a nivel sistémico mediante marcadores de estrés  
517 en muestras de plasma, esto no descarta que exista un mayor daño oxidante en algunos tejidos  
518 y órganos como el cerebro. De hecho, se conoce que durante la DM existen tejidos que son más

519 susceptibles al daño por estrés, y son los que están relacionados con las complicaciones  
520 diabéticas como las retinopatías, nefropatías y neuropatías. Esto ocurre debido a que en estas  
521 células, los transportadores de glucosa no dependen de la acción de la insulina para que la  
522 glucosa ingrese la célula. Por lo tanto, en condiciones de hiperglucemia crónica, esos tejidos  
523 reciben un mayor aporte de glucosa y por ende, tienen mayor susceptibilidad a sufrir daño por  
524 estrés como el cerebro (66). De este modo, se hace crucial, evaluar la presencia de daño oxidante  
525 en el cerebro y de manera particular en los diferentes núcleos del hipotálamo.

526 En conjunto, estos datos demuestran en nuestro modelo de estudio (2nSTZ70 mg + SSB10%)  
527 el papel antihiperglucemiante de la metformina y EAE, y efecto hipoglucemiante del resveratrol,  
528 curcumina y alimentación controlada. Así mismo, se evidencia que los tratamientos son  
529 incapaces de controlar la hiperfagia diabética; sin embargo, el EAE y la curcumina promueven  
530 la disminución del NPY, mientras que la metformina y la curcumina mostraron una tendencia a  
531 restaurar la expresión de POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo de animales diabéticos. De  
532 igual manera, se demostró el papel protector de la curcumina ante el estrés oxidante,  
533 promoviendo al incremento en la actividad de la enzima antioxidante GST y evitando la  
534 peroxidación de lípidos, lo cual se evidenció al encontrar una menor concentración de MDA.

535 Los hallazgos encontrados en el presente estudio demuestran que los tratamientos empleados,  
536 en las dosis y tiempos administrados, pueden mejorar la condición diabética de manera parcial  
537 y sugieren que la curcumina y el EAE pueden tener un mayor efecto benéfico si el tratamiento  
538 se prolonga y/o se aumentan las dosis.

#### 539 **Conflicto de interés.**

540 Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

#### 541 **Financiamiento.**

542 Proyectos de infraestructura 269889 y 269696 y beca 429417. Financiamiento por CONACyT.

#### 543 **Agradecimientos.**

544 A la Dra. Mónica Lamas Gregori y la Dra. Gisela por su apoyo técnico.

545 **Referencias.**

- 546 1. Arora S, and Anubhuti (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity  
547 – A review. *Neuropeptides* 40 375–401.
- 548 2. Kim JD, Leyva S, and Diano S, (2014). Hormonal regulation of the hypothalamic  
549 melanocortin system. *Frontiers in Physiology*. 5: 480 1-7
- 550 3. Parker JA, y Bloom SR (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of  
551 appetite. *Neuropharmacology*. 63: 18-30
- 552 4. Simpson KA, Martin NM, Bloom SR (2009). Hypothalamic regulation of food intake  
553 and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 53(2):120-8.
- 554 5. American Diabetes Association (2017). Diagnosis and Classification of Diabetes  
555 Mellitus. *Diabetes Care*, 37:1 S81–S90.
- 556 6. Federación Internacional de Diabetes (Ed.) (2017). Atlas de la Diabetes de la FID,  
557 Séptima ed.
- 558 7. Beagley J, Guariguata L, Weil C, Motala AA, (2013). Global estimates of undiagnosed  
559 diabetes in adults for 2013 for the IDF Diabetes Atlas. *Diabetes Res. Clin. Pract.*,1872-  
560 8227
- 561 8. Mao F, Xiujun L, Min Z, Yang X, (2002). Increased expression of neuropeptide Y and  
562 its mRNA in STZ-diabetic rats. *Chinese Medical Journal*, 115 (5): 690-695.
- 563 9. German JP, Wisse BE, Thaler JP, Oh-I S, Sarruf DA, Ogimoto K, Kaiyala KJ, Fischer  
564 JD, Matsen ME, Tabor sky GJ, Schwartz MW, and Morton GJ, (2010). Leptin Deficiency  
565 Causes Insulin Resistance Induced by Uncontrolled. Diabetes. *Diabetes*, 59:1626–1634.
- 566 10. Fu M, Li X, Zhang M, Xian Y, (2002). Increased expression of neuropeptide Y and its  
567 mRNA in STZ-diabetic rats. *Chin Med J (Engl)*, 115(5):690-5.
- 568 11. Havel P. J., Hahn T. M., Sindelar D. K., Baskin D. G., Dallman M. F., Weigle D. S., and  
569 Schwartz M. W., (2000). Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin  
570 treatment on the hypothalamic melanocortin system and muscle uncoupling protein 3  
571 expression in rats. *Diabetes*. 49: 244-252.
- 572 12. Havel P, et al. 1998. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin  
573 diabetic rats: revers by insulin. *Am. J. Physiol*, 274, R1482-R1491.
- 574 13. Obici S, Feng Z, Karkanias G, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors  
575 causes hyperphagia and insulin resistance in rats. 2002 Jun; 5(6):566-72. print
- 576 14. Sindelar, D. et al. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats.  
577 *Diabetes* 48, 1275-1280 (1999).
- 578 15. Sindelar DK, Mystkowski P, Marsh DJ, Palmiter RD, (2002). Attenuation of diabetic  
579 hyperphagia in neuropeptide Y-deficient mice. *Diabetes*, 51: 778-783.
- 580 16. Sipols, A. J., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W. Effect of intracerebroventricular insulin  
581 infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression.  
582 *Diabetes* 44, 147–151 (1995).
- 583 17. Williams, G. et al. Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic  
584 regions of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 38, 321–327 (1989).
- 585 18. Niedowicz, D.M., Daleke, D.L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic  
586 complications. *Cell Biochem. Biophys*. 43, 289–330.
- 587 19. David, J. A., Rifkin, W. J., Rabbani, P. S., & Ceradini, D. J. (2017). The  
588 Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II

- 589 Diabetes Mellitus. *Journal of diabetes research*, 2017, 4826724.  
590 doi:10.1155/2017/4826724
- 591 20. Yang, H., Jin, X., Kei Lam, C.W., Yan, S.-K. (2011). Oxidative stress and diabetes  
592 mellitus. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC*. 49, 1773–1782
- 593 21. Benani A., Troy S., Carmona M., Fioramonti X., Lorsignol A., Leloup C., Casteilla L.,  
594 Pénicaud L., (2007). Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid  
595 sensing. *Diabetes*, 56:152–160.
- 596 22. Diano Sabrina (2013). Role of Reactive Oxygen Species in Hypothalamic Regulation of  
597 Energy Metabolism. *Endocrinol Metab*, 28:3-5
- 598 23. Drougard A, Fournel A, Valet P, and Knauf C (2015). Impact of hypothalamic reactive  
599 oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Frontiers in*  
600 *Neuroscience*, 9 (56):1-12.
- 601 24. Jaillard T, Roger M, Galinier A, Guillou P, Benani A, Leloup C, Casteilla L, Pénicaud  
602 L, Lorsignol A (2009). Hypothalamic Reactive Oxygen Species Are Required for  
603 Insulin-Induced Food Intake Inhibition: An NADPH Oxidase–Dependent Mechanism.  
604 *Diabetes*, 58: 1544-1549
- 605 25. Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschöp MH,  
606 Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, and Diano S  
607 (2008). UCP2 mediates ghrelin’s action on NPY/AgRP neurons by lowering free  
608 radicals. *Nature*, 454: 846–851.
- 609 26. Tamas LH, Zane B, Andrews and Sabrina Diano (2008). Fuel utilization by  
610 hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 20:2  
611 p78-87.
- 612 27. Colín-Gonzalez Ana L., Santana Ricardo A., Silva Islas Carlos A., Chánez-Cárdenas  
613 Maria E, Santamaría Abel and Maldonado Perla D, (2012). The Antioxidant Mechanism  
614 Underlying the Aged Garlic Extract and S-Allylcysteine-Induced Protection. *Oxidative*  
615 *Medicine and Cellular Longevity*, (907162): 1-16.
- 616 28. Eidi A., Eidi M., Esmaeili E. (2006). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in  
617 normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 13: 624–629
- 618 29. Ray B., Chauhan N. B., Lahiri D., (2011). Oxidative insults to neurons and synapse are  
619 prevented by Aged Garlic Extract (AGE) and S-allyl-L-Cysteine (SAC) treatment in the  
620 neuronal culture and APP-Tg mouse model. *J Neurochem*, 117(3): 388–402
- 621 30. Jing Yu-Hong, Chen Kuan-Hsing, Kuo Pei-Ching, Pao Chia-Chi, Chen Jan-Kan (2013).  
622 Neurodegeneration in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Is Attenuated by Treatment  
623 with Resveratrol. *Neuroendocrinology*, 98:116–127
- 624 31. El-Bahr SM (2013). Curcumin regulates gene expression of insulin like growth factor,  
625 B-cell CLL/lymphoma 2 and antioxidant enzymes in streptozotocin induced diabetic  
626 rats. *Complementary & Alternative Medicine*, 13(368): 1-11
- 627 32. Kuhad, A. y Chopra K. (2007). Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats:  
628 Behavioral and biochemical evidences. *European Journal of Phramacology*, 576 34-42.
- 629 33. Barragán-Bonilla MI, Mendoza-Bello JM, Aguilera P, Parra-Rojas, Illaader Aguiar B,  
630 Ramírez M, Espinoza-Rojo, (2019) Combined Administration of Streptozotocin and  
631 Sucrose Accelerates the Appearance of Type 2 Diabetes Symptoms in Rats. *Journal of*  
632 *Diabetes Research*. Article ID 3791061
- 633 34. Gérard-Monnier D1, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J.  
634 (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-



- 635 hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation.  
636 Chem Res Toxicol. 11(10):1176-83.
- 637 35. C. O. Eleazu, K. C. Eleazu, S. Chukwuma, and U. N. Essien, "Review of the mechanism  
638 of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its  
639 practical use and potential risk to humans," *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*,  
640 vol. 12, no. 1, p. 60, 2013
- 641 36. S. Bonner-Weir, D. F. Trent, R. N. Honey, and G. C. Weir, "Responses of neonatal rat  
642 islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia," *Diabetes*, vol.  
643 30, no. 1, pp. 64–69, 1981.
- 644 37. M. Kataoka, Y. Kawamuro, N. Shiraki et al., "Recovery from diabetes in neonatal  
645 mice after a low-dose streptozotocin treatment," *Biochemical and Biophysical  
646 Research Communications*, vol. 430, no. 3, pp. 1103–1108, 2013.
- 647 38. A. Lana, F. Rodríguez-Artalejo, and E. Lopez-Garcia, "Consumption of sugar-  
648 sweetened beverages is positively related to insulin resistance and higher plasma leptin  
649 concentrations in men and nonoverweight women," *The Journal of Nutrition*, vol. 144,  
650 no. 7, pp. 1099–1105, 2014.
- 651 39. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenhom, Rooyackers O, Zhou G,  
652 Williamson J, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, y Goodyear LJ., (2002).  
653 Metformin Increases AMP-Activated Protein Kinase Activity in Skeletal Muscle of  
654 Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 51, 2074-2081.
- 655 40. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J.,  
656 Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001.  
657 Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.*  
658 108, 1167–1174.
- 659 41. Castro-Martínez, M. G., Cartillo-Anaya, V., Ochoa-Aguilar, A., & Godínez-Gutiérrez,  
660 S. A. (2014). La metformina y sus aplicaciones actuales en la clínica Metformin and its  
661 current applications in the clinical setting. *Med Int Méx*, 30, 562–574.
- 662 42. Dolinsky VW1, Chan AY, Robillard Frayne I, Light PE, Des Rosiers C, Dyck JR (200).  
663 Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1.  
664 *Circulation*. 31;119(12):1643-52. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.787440.
- 665 43. Barragán-Bonilla MI, Aguilera P, Espinoza-Rojo M, (2015). Aged garlic extract  
666 increases neuropeptide y, superoxide dismutase 2, catalase and glutathione peroxidase  
667 mRNA levels in hypothalamus of diabetic rats. Meeting of Society for Neuroscience.  
668 E.05. Stress and the Brain.
- 669 44. Blanco Basilio y Magallón Tapia, (2014). Regulación de GLUT2 por extracto de ajo  
670 envejecido en un modelo in vivo de diabetes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias  
671 Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.
- 672 45. Barragán BMI, Rodríguez RHA, (2013). Efecto del extracto de ajo envejecido sobre el  
673 nivel del mRNA de GLUT1 y GLUT4 en un modelo in vivo de diabetes mellitus (Tesis  
674 de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de  
675 Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.
- 676 46. De la Cruz Concepción B., Barrera Navarrete P., (2014). Efecto del extracto de ajo  
677 envejecido sobre la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3 en cerebro de ratas  
678 diabéticas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad  
679 Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.

- 680 47. Rouse M, Younès A, & Egan JM, (2014). Resveratrol and curcumin enhance pancreatic  
681  $\beta$ -cell function by inhibiting phosphodiesterase activity. *The Journal of endocrinology*,  
682 223(2), 107–117. doi:10.1530/JOE-14-0335
- 683 48. Rashid K1, Sil PC2. (2014) Curcumin enhances recovery of pancreatic islets from  
684 cellular stress induced inflammation and apoptosis in diabetic rats. *Toxicol Appl*  
685 *Pharmacol.* 2015 Feb 1;282(3):297-310. doi: 10.1016/j.taap.2014.12.003.
- 686 49. Kaur Gagandeep, Padiya Raju, Adela Ramu, Putcha Uday K., Reddy G. S., Reddy B.  
687 R., Kumar K. P., Chakravarty Sumana, Banerjee Sanjay K. (2016). Garlic and  
688 Resveratrol Attenuate Diabetic Complications, Loss of  $\beta$ -Cells, Pancreatic and Hepatic  
689 Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Frontiers in Pharmacology*.  
690 7:360 DOI=10.3389/fphar.2016.00360.
- 691 50. Atsushi Miki, Camillo Ricordi, Yasunaru Sakuma, Toshiyuki Yamamoto, Ryosuke  
692 Misawa, Atsuyoshi Mita, Ruth D. Molano, Nosratola D. Vaziri, Antonello Pileggi,  
693 Hirohito Ichii (2018). Divergent antioxidant capacity of human islet cell subsets: A  
694 potential cause of beta-cell vulnerability in diabetes and islet transplantation. *PlosOne*.
- 695 51. Palsamy, P. and Subramanian, S. (2008) Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes  
696 hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats.  
697 *Biomedicine and Pharmacotherapy* 62, 598–605.
- 698 52. Thota, R. N., Dias, C. B., Abbott, K. A., Acharya, S. H., & Garg, M. L. (2018). Curcumin  
699 alleviates postprandial glycaemic response in healthy subjects: A cross-over,  
700 randomized controlled study. *Scientific reports*, 8(1), 13679. doi:10.1038/s41598-018-  
701 32032-x
- 702 53. Thomson M, Al-Qattan KK, Divya JS, y Ali M, (2016). Anti-diabetic and anti-oxidant  
703 potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin-induced diabetic rats *BMC*  
704 *Complementary and Alternative Medicine*; 16:17, 1-9
- 705 54. Meyts P. (2016). *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*. National  
706 Library of Medicine, National Institutes of Health, 1-22.
- 707 55. Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). OXIDATIVE STRESS, INSULIN SIGNALING  
708 AND DIABETES. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(5), 567–575.
- 709 56. Almazán Gregorio y Bahena Cuevas (2017). Expresión y fosforilación del receptor de  
710 insulina post-tratamiento con extracto de ajo envejecido y metformina en un modelo in  
711 vivo de diabetes. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químico Biológicas,  
712 Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.
- 713 57. Montes-Cortes DH1, Hicks JJ, Ceballos-Reyes GM, Garcia-Sanchez JR, Medina-  
714 Navarro R, Olivares-Corichi IM, (2010). Chemical and functional changes of human  
715 insulin by in vitro incubation with blood from diabetic patients in oxidative stress  
716 *Metabolism*. 59(7):935-42. doi: 10.1016/j.metabol.2009.10.013.
- 717 58. Ramírez S1, Claret M (2015). Hypothalamic ER stress: A bridge between leptin  
718 resistance and obesity. *FEBS Lett.* 2015 Jun 22;589(14):1678-87. doi:  
719 10.1016/j.febslet.2015.04.025.
- 720 59. Chau-Van C., Gamba M., Salvi R., Gaillard R. C. y Pralog F. P. 2007. Metformin  
721 Inhibits Adenosine 5'-Monophosphate- Activated Kinase Activation and Prevents  
722 Increases in Neuropeptide Y Expression in Cultured Hypothalamic Neurons.  
723 *Endocrinology* 148(2):507–511.
- 724 60. Parihar P1, Shetty R1, Ghafourifar P2, Parihar MS (2016). Increase in oxidative stress  
725 and mitochondrial impairment in hypothalamus of streptozotocin treated diabetic rat:

726 Antioxidative effect of *Withania somnifera*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016 Jan  
727 22;62(1):73-83.

728 61. Johnson J. A., Johnson Delinda A., Kraft A. D., Calkins MJ, Jakel RJ, Vargar MR, Chen  
729 PC, (2008). The Nrf2-ARE Pathway: An Indicator and Modulator of Oxidative Stress in  
730 Neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 1147: 61–69.

731 62. Kohda K., Goda H., Itoh K., Samejima K., Fukuuchi T., (2013). Aged Garlic Extract  
732 Reduces ROS Production and Cell Death Induced by 6-Hydroxydopamine through  
733 Activation of the Nrf2-ARE Pathway in SH-SY5Y Cells. *Pharmacology & Pharmacy*,  
734 4, 31-40.

735 63. Richard J. Alsop, Alexander Dhaliwal Maikel and C. Rheinstädter (2017). Curcumin  
736 Protects Membranes through a Carpet or Insertion Model Depending on Hydration.  
737 *American Chemical Society*. 33348516-8524.

738 64. Ramakrishna, Vadde & Jaiikhani, Rama. (2008). Oxidative stress in non-insulin-  
739 dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta diabetologica*. 45. 41-6.  
740 10.1007/s00592-007-0018-3.

741

## DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se determinaron las condiciones para generar un modelo en ratas de diabetes similar a la DM tipo 2, que nos permitiera evaluar el efecto de tratamientos con actividad antioxidante sobre la hiperfagia diabética con relación al estrés oxidante sistémico y a los cambios en la expresión de moléculas centrales (NPY y POMC) y periféricas (glucosa, insulina y leptina) que regulan la conducta alimentaria.

En la implementación de un modelo de DM tipo 2, empleamos ratas macho y hembras de la cepa Wistar, al 2º día de edad se les administró STZ en dosis diferentes (70 o 90 mg/kg de peso corporal), y al destete se les proporcionó una bebida endulzada con sacarosa comercial (SSB; *sucrose-sweetened beverage*) en periodos de diferente duración (7 u 11 semanas) y concentraciones distintas (10 o 30 %).

La STZ es un fármaco que se ha usado ampliamente para la inducción de DM, cuyo mecanismo de acción es la inducción de muerte celular por estrés oxidante, esto conlleva a una producción y secreción de insulina disminuida o nula, y por lo tanto, al establecimiento de hiperglucemia (Elezau et al., 2013). Cuando este fármaco se emplea en animales adultos, induce al establecimiento de síntomas característicos de la DM de manera espontánea y severa, por lo que se sugiere que podría ser un buen modelo de estudio de la DM1 (Takasu, et al, 1991). En contraste, cuando este fármaco se inyecta en ratas de edad neonatal, induce daño parcial de las células beta del páncreas, debido a que, en esa edad de los animales, aún existe capacidad de regeneración celular ante alguna agresión, y las alteraciones en la homeostasis de la glucosa se desarrollan de manera gradual (Bonner-Weir, et al., 1981; Kataoka et al., 2013; Marathe et al., 2006)

En nuestro estudio encontramos que la administración de STZ en la dosis más alta (90 mg/kg) indujo la mayoría de las características de la DM en machos y hembras, como hiperglucemia crónica, poca ganancia de peso corporal e hiperfagia, además de resistencia moderada a la insulina sólo en hembras. A pesar de que es una dosis ampliamente usada en la investigación (Bonner *et al.*, 1981; Patil *et al.*, 2014; Thorens

*et al.*, 1990; Patel *et al.*, 2015; Sung *et al.*, 2015), su implementación como modelo de estudio es limitada puesto que, en nuestro trabajo, también indujo una mortalidad elevada en los animales que recibieron esta dosis.

Por el contrario, la inyección de 70 mg de STZ, solamente generó intolerancia a la glucosa y resistencia moderada a la insulina en ambos sexos. Su efecto menor puede deberse a que el daño generado en las células  $\beta$  pancreáticas, es dependiente de la concentración de la STZ (Nahdi *et al.*, 2017). Será determinante evaluar la intensidad del daño en las células  $\beta$  del páncreas en ambos modelos.

Como parte del establecimiento del modelo de DM2, la dosis de 70 mg de STZ fue seleccionada en combinación con la SSB al 10%. El estudio incluyó grupos controles con SSB con el fin de descartar que las alteraciones en la homeostasis de la glucosa generadas sean únicamente por la SSB.

Encontramos que el consumo de SSB al 10% en ratas de ambos sexos, en diferentes tiempos y concentraciones, sin la previa administración de STZ en edad neonatal, no afecta la concentración de glucosa sanguínea en ayuno, ni la respuesta normal a la administración de glucosa en la prueba de tolerancia oral a la glucosa (CTOG), sin embargo, los grupos conformados por machos muestran una mayor ganancia de peso corporal y resistencia moderada a la insulina.

A pesar de que en reportes previos, se ha demostrado que el consumo elevado de carbohidratos durante periodos crónicos, conducen a alteraciones en la homeostasis de la glucosa, resistencia a la insulina y obesidad (Del Toro *et al.*, 2016; Franklin *et al.*, 2016; Kanarek *et al.*, 1979; Lana *et al.*, 2014), en nuestro estudio, la ingesta de SSB no es un factor suficiente para generar alteraciones en la homeostasis de la glucosa, posiblemente, debido a que la SSB fue dada por un periodo más corto (7 u 11 semanas) en comparación con otros estudios. Es probable que el organismo tenga la capacidad de compensar el alto consumo de azúcar al promover una mayor síntesis y secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas, por lo tanto, la hiperinsulinemia sería responsable de evitar una respuesta alterada en la CTOG.

Se ha descrito que, bajo demanda metabólica incrementada, la actividad de las células  $\beta$  se incrementa y/o existe una expansión de la población de las células  $\beta$ , proceso que puede ser debido a autoduplicación de las células  $\beta$  preexistentes o a la transdiferenciación de las células alfa pancreáticas (Nir et al, 2007, Thorel et al., 2010). En estudios futuros, será necesario evaluar la concentración de insulina e identificar la expansión de la población de las células  $\beta$  que nos permitan explicar este hallazgo con mayor precisión.

En el caso de las ratas con administración previa de STZ, encontramos que la ingesta de SSB a diferentes concentraciones y periodos estimula un incremento en la glicemia basal y una respuesta disminuida a la glucosa administrada en la CTOG, en ratas de ambos sexos. Como previamente se describió, el mecanismo de acción de la STZ administrada en edad neonatal, es inducir daño parcial a las células  $\beta$  del páncreas, esto significa que, en edad adulta, aún son capaces de producir insulina en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre, por ejemplo, después de ingerir alimentos (Bonner-Weir, et al., 1981; Kataoka et al., 2013; Marathe et al., 2006). De este modo, el hecho de estimular de manera constante la producción de insulina mediante el consumo moderado de azúcar en una bebida, podría promover un mayor daño a las células  $\beta$  pancreáticas. Entonces, debido al daño generado en estas células en edad neonatal, su capacidad para expandir su población está limitada, resultando en un fallo para compensar al organismo ante una mayor demanda metabólica (Nir et al, 2007, Thoren et al., 2010; Pick et al., 1998).

De forma interesante, se encontró que la hiperglucemia en ayuno fue más pronunciada en grupos de STZ con SSB en la concentración baja (10 %) y periodo temporal (7 semanas). Este efecto podría explicarse debido a que cuando a las ratas se les proporciona una bebida azucarada a una concentración mayor (30 %), y en un periodo prolongado (11 semanas), ocurre un proceso de adaptación de las células beta remanentes y funcionales, previniendo de este modo al establecimiento temprano de los síntomas de la DM (Nir et al, 2007, Thorel et al., 2010). Mientras que cuando se da una concentración baja de sacarosa y periodo temporal, la adaptación del organismo

no ocurre; de manera que el daño generado en las células beta se hace más evidente en etapas tempranas con la presencia de hiperglucemia y síntomas de la DM.

La resistencia a la insulina es una característica clave de la DM2, aunque en reportes previos se ha demostrado que sólo la administración de STZ en edad neonatal o únicamente las dietas altas en carbohidratos inducen resistencia a la insulina; en nuestro estudio, los animales presentaron una resistencia moderada a la insulina, siendo más marcada en animales que recibieron STZ y SSB. Esta condición fue evidenciada en una prueba de tolerancia a la insulina (CTI) en la que se observan los cambios en la concentración de glucosa sanguínea en respuesta a la administración de insulina exógena. Será necesario demostrar si esta respuesta baja a la insulina se debe a una densidad disminuida de los receptores a la insulina sobre los tejidos, defectos en su vía de señalización o daño oxidativo a la insulina administrada exógenamente (Ivonne et al., 2005; Tangvarasittichai et al., 2015).

Por otra parte, también observamos que un consumo prolongado de SSB (11 semanas), condujo a una disminución en la ingesta de alimentos en todos los grupos (sin y con STZ) de ambos sexos. Es probable que el consumo constante de sacarosa en forma de bebida estimule señales para la saciedad, lo cual podría explicar la disminución del consumo de alimento sólido. Existen reportes que la glucosa libre (obtenida por degradación de la sacarosa), es responsable de promover señales de saciedad en el hipotálamo (Leloup et al., 2006)

De forma contraria, los animales inyectados con STZ y con ingesta de SSB en concentración baja y periodo temporal (10 % por 7 semanas), mostraron hiperfagia. Este síntoma puede ser resultado de la falla en el mecanismo de compensación del organismo antes descrito. La falta de nutrientes en los tejidos sensibles a la insulina, la baja producción y secreción de insulina por las células beta del páncreas, o resistencia a esta hormona en el hipotálamo, podrían explicar en parte la presencia de hiperfagia diabética.

Adicionalmente, los animales que tuvieron STZ y SSB, mostraron una menor ganancia de peso corporal. Este hallazgo es debido a la incapacidad de las células

para usar la glucosa como fuente principal de energía, por lo que se degradan ácidos grasos y proteínas presentes en los tejidos para mantener las funciones energéticas del organismo (German et al., 2009).

En contraste, en grupos formados por hembras, la ingesta de SSB, no modificó la tolerancia a la insulina, esto puede deberse a que los animales empleados en esta investigación son considerados jóvenes adultos, en esta etapa, los niveles elevados de estrógenos en las hembras, actúa como un factor protector contra el desarrollo de la DM (Le et al., 2006). Se ha reportado que los estrógenos previenen la muerte de las células  $\beta$  cuando hay una exposición a concentraciones elevadas de glucosa en sangre de manera crónica; de este modo, se evita la aparición de signos y síntomas característicos de la DM solamente en hembras (Suwattanee *et al.*, 2018). Con relación a esto, las hembras no presentan cambios de peso corporal drásticos en comparación con los grupos conformados por machos. Así mismo, la conducta hiperfágica no se presenta en las hembras.

Resumiendo la primera parte de la investigación consistente en establecimiento de un modelo de DM, encontramos dos modelos importantes y diferentes que pueden ser útiles en la investigación, y su uso dependerá de los objetivos que se persigan: 1) Ratas machos y hembras con inyección de STZ (70 mg/kg) en edad neonatal muestran sólo resistencia moderada a la insulina e intolerancia a la glucosa; y 2) ratas machos que con inyección de STZ (70 mg/kg) en edad neonatal en combinación con SSB al 10 % durante 7 semanas, desarrollaron resistencia moderada a la insulina, hiperglucemia en ayuno, ganancia de peso corporal disminuida e hiperfagia. Este último modelo, consideramos que es el que representa mejor a la DM2.

Adicionalmente, logramos reproducir un modelo de DM previamente reportado, mediante la administración de 90 mg de STZ, sin embargo, enfatizamos que su uso en la investigación puede ser difícil debido a que esta dosis induce una mortalidad elevada en los animales.

En la segunda parte del trabajo que consistió en evaluar el efecto de tratamientos con actividad antioxidante sobre la hiperfagia diabética en relación al



estrés oxidante sistémico y a los cambios en la expresión de moléculas que regulan el apetito, decidimos emplear el modelo de ratas machos a los que se les inyectó 70 mg de STZ/kg de peso corporal en edad neonatal y se les dio SSB al 10 % en un periodo corto.

Adicional a las características reportadas en este modelo (hiperglucemia crónica, resistencia moderada a la insulina, poca ganancia de peso corporal e hiperfagia) por nuestro grupo de trabajo (Barragán-Bonilla et al., 2019), encontramos que las ratas presentaron un bajo grado de estrés oxidante en circulación (actividad enzimática disminuida de GPx y GST), concentración baja de insulina y elevada de leptina en plasma, así como expresión aumentada de NPY y disminuida de POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo.

La hiperglucemia crónica, como se ha explicado anteriormente, es debida a que la inyección de STZ en edad neonatal, induce destrucción parcial de las células  $\beta$  del páncreas, y junto con el consumo de agua azucarada, promueven a una disminución en la producción y secreción de insulina en ratas de edad adulta (Bonner-Weir, et al., 1981; Kataoka et al., 2013; Marathe et al., 2006), y en concordancia, encontramos una disminución en la concentración de insulina plasmática.

El tratamiento con metformina mostró un efecto anti-hiperglucemiante. Su mecanismo de acción consiste en la estimulación de AMPK en tejidos periféricos como músculo, tejido adiposo e hígado. AMPK es una cinasa que promueve el anclaje del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana celular para permitir la entrada de la glucosa hacia la célula; en hígado, AMPK activo, induce la disminución en la producción de glucosa hepática, en conjunto, esto conlleva a una disminución de la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo. Su efecto hipoglucemiante demostrado en otros estudios (Musi et al., 2002; Zhou et al., 2002), puede verse limitado por la presencia de estrés oxidante; Dolinsky y col., (2014), demostraron que la actividad de AMPK es afectada por 4-Hidroxinonenal (4-HNE), un producto derivado de la peroxidación lipídica. En estudios posteriores, será crucial evaluar la activación de AMPK en respuesta al tratamiento con metformina en nuestro modelo de estudio.

El extracto de ajo envejecido también mostró un efecto antihiper glucemiante en dosis de 200 mg/kg por vía oral. En nuestro grupo de trabajo, previamente habíamos encontrado este efecto en un modelo de DM inducido mediante la administración únicamente de STZ (60 mg/kg) en edad adulta. Se sugiere que parte de su mecanismo es a través de la modificación en la expresión de transportadores de glucosa como GLUT2 en hígado, GLUT1 y GLUT4 en músculo, GLUT1, GLUT3 y GLUT4 en cerebro (Barragán y Rodríguez, 2013; Blanco y Magallón, 2014; De la Cruz y Barrera, 2014, Mendoza-Bello, 2015).

En cuanto al resveratrol y la curcumina, que tuvieron actividad hipoglucemiante, se ha evidenciado en otros estudios, que compuestos con capacidad antioxidante pueden proteger a las células del estrés oxidativo y con esto, evitar la muerte celular (Rouse et al., 2014; Kaur et al., 2016; Rashid et al., 2014). Las células  $\beta$  del páncreas tienen una baja capacidad antioxidante, lo que las hace susceptibles a daño por estrés oxidante, consecuentemente a muerte celular y, por lo tanto, producción baja o nula de insulina (Atsushi et al., 2018). En diferentes modelos experimentales de DM, el EAE o su componente principal (S-alilcisteína), resveratrol y curcumina promueven el aumento en la concentración de insulina plasmática (Palsamy et al., 2008; Thota et al., 2018; Thomson et al., 2016); en nuestro estudio, el nivel de insulina en plasma de animales diabéticos tratados, es inferior al grupo control, pero ligeramente incrementado en los grupos que recibieron EAE o resveratrol con respecto al grupo de DM sin tratamiento, esto refleja posiblemente que ambos tratamientos podrían prevenir parcialmente la muerte de las células  $\beta$ , sin embargo, será crucial evaluar su papel protector sobre estas células.

Otro mecanismo propuesto para el control de la glucosa sanguínea es a través del aumento en la sensibilidad a la insulina. En condiciones fisiológicas normales, la unión de insulina a su receptor en las células del músculo y tejido adiposo promueve la fosforilación del receptor de insulina en residuos de tirosina, esto activa la vía de señalización PI3k/Akt y se estimula el anclaje del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana para el ingreso de la glucosa al interior de la célula (Meyts, 2016). Durante la DM, el estrés oxidante afecta la cascada de señalización de la insulina a

causa de la fosforilación en residuos de serina del receptor de la insulina (Rains y Jain, 2011). La sensibilidad baja a la insulina en el grupo de animales diabéticos sin tratamiento se evidenció mediante una prueba de tolerancia a la insulina, en la que se mide la respuesta a esta hormona cuando es administrada de manera exógena.

La acción antioxidante de los tratamientos evaluados es importante en la prevención de la activación de las vías de señalización sensibles al estrés. En nuestro estudio, los animales diabéticos con tratamientos favorecen una mayor sensibilidad a la insulina. En el caso del EAE, nuestro grupo de trabajo ha mostrado que, en animales diabéticos, estimula una mayor fosforilación en residuos de tirosina del receptor de insulina en el músculo (Almazán y Bahena, 2017).

Adicionalmente, Ivonne *et al.*, (2005), encontraron que, en pacientes diabéticos, las EROs pueden oxidar a la insulina cuando es administrada de manera exógena, esto explicaría en parte la baja respuesta a la insulina que los animales diabéticos tuvieron en la prueba de tolerancia a la insulina. Por lo tanto, el uso de antioxidantes como tratamiento durante la diabetes, es importante para mantener la integridad de macromoléculas.

Con relación a la hiperfagia, se trata de una conducta característica de la DM y está relacionada directamente con el aumento en la expresión de NPY y disminución de POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo (Mao et al., 2002; Fu et al., 2002; Havel et al., 2000). La expresión de estos neuropéptidos está regulada en mayoritariamente por la acción de hormonas circulantes que participan en control del apetito y saciedad, como insulina, leptina y grelina, y la función de éstas, se encuentra determinada por su expresión y secreción al torrente sanguíneo, además de la correcta funcionalidad de sus receptores en el tejido hipotalámico (German et al., 2010; Havel et al., 1998 y 2000; Obici et al., 2002).

En la presente investigación, la conducta hiperfágica que presentaron los animales diabéticos es explicada por el aumento en la expresión de NPY y disminución de POMC en el núcleo arcuato. A su vez, los cambios en la expresión de los neuropéptidos, es debida en parte, a la disminución en la concentración de insulina en

plasma. La insulina es una de las hormonas que, a nivel central, inhiben el apetito (Havel et al., 2000; Obici et al., 2002). Leptina es otra de las hormonas importantes que disminuyen el apetito (Havel et al., 1998; Sindelar et al., 1999); en nuestro estudio, encontramos que el nivel de leptina se encuentra ligeramente incrementado. Bajo condiciones fisiológicas normales, el aumento en la concentración de leptina plasmática explicaría un aumento en la saciedad, sin embargo, los animales presentan hiperfagia; esto puede ser debido a que a pesar de que existan niveles incrementados de leptina, la presencia de resistencia a esta hormona impida que lleve a cabo su efecto orexigénico (Ramírez y Claret, 2015). El estrés oxidante juega un papel clave en este proceso, ya que se ha descrito que también afecta la señalización normal de la leptina, probablemente, por esa razón, el nivel de NPY se encuentra incrementado y el de POMC está disminuido a pesar de los niveles ligeramente elevados de leptina.

La administración de metformina o antioxidantes no tuvo un efecto importante sobre la hiperfagia diabética, como previamente se ha demostrado en otros estudios (Chau-Van et al., 2007). Únicamente, la curcumina mostró una tendencia ligera a atenuar esta condición, sin embargo, los cambios no son importantes en términos estadísticos. Adicionalmente, el EAE y la curcumina lograron disminuir la expresión de NPY en el núcleo arcuato del hipotálamo, aunque el nivel de POMC, en el caso del grupo con EAE, fue similar al grupo diabético sin tratamiento; y cuando recibieron curcumina, el nivel de POMC se muestra similar al grupo sin diabetes. Estos hallazgos, demuestran el posible papel del EAE y la curcumina en promover la disminución de la hiperfagia diabética.

Debido a que los animales diabéticos con cualquiera de los tratamientos tienen una persistencia de la hiperfagia diabética, a pesar de la disminución del NPY en el hipotálamo, parece que es necesario el aumento importante en la expresión de POMC para inducir la disminución de la hiperfagia. Además, la inducción de la saciedad no sólo depende de hormonas como leptina e insulina, y neuropéptidos como NPY y POMC, sino que existen una variedad de moléculas que intervienen en esta regulación y que ejercen su efecto sobre otros núcleos dentro y fuera del hipotálamo (Arora y Anubhuti, 2006; Kim et al., 2014; Simpson et al., 2009). Así mismo, la integridad de las

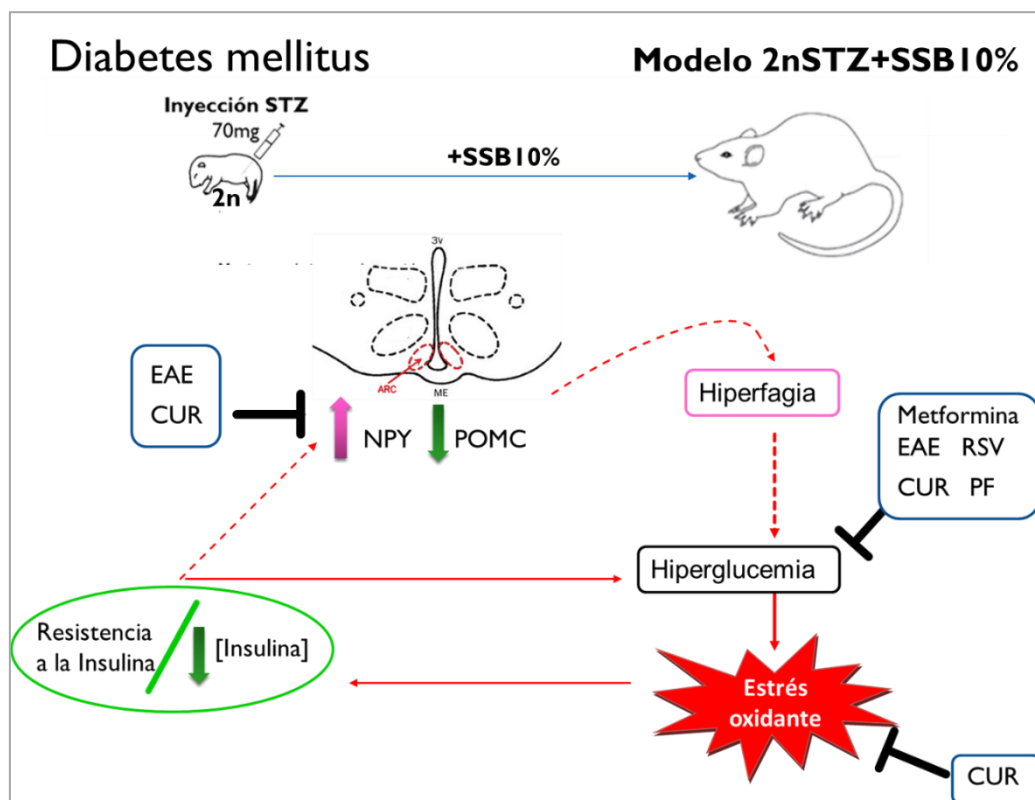
poblaciones neuronales de segundo orden es crucial para llevar a cabo una neurotransmisión de señales adecuadas. Numerosos reportes indican que el estrés oxidativo en zonas específicas del hipotálamo puede favorecer a la persistencia de hiperfagia (Parihar et al., 2016).

En este estudio, también se evaluó el estrés oxidante a nivel sistémico, y se encontró que los animales diabéticos tienen estrés oxidante moderado. La curcumina fue el antioxidante exógeno que mostró mayor potencial para disminuir el estrés oxidante al favorecer el aumento en la actividad de las enzimas GPx y GST, y disminución en la concentración de MDA. Las investigaciones demuestran que los antioxidantes exógenos pueden estimular la expresión de las enzimas antioxidantes a través de la activación del factor de transcripción Nrf2, proteína que se une a elementos de respuesta a antioxidantes (ARE, *antioxidant response element*) que se encuentran en los promotores de las enzimas antioxidantes (Johnson et al., 2008; Kohda et al., 2013). Aunado a su capacidad para incrementar el sistema de defensa antioxidante, la disminución en el nivel de MDA puede deberse a que la curcumina es un componente que puede anclarse a las membranas celulares y de esta manera, protegerlas de la peroxidación lipídica (Alsop et al., 2017).

Aunque se encontró estrés oxidativo moderado a nivel sistémico mediante marcadores de estrés en muestras de plasma, esto no descarta que exista un mayor daño oxidante en algunos tejidos y órganos como el cerebro. De hecho, se conoce que, durante la DM existen tejidos que son más susceptibles al daño por estrés, y son los que están relacionados con las complicaciones diabéticas como las retinopatías, nefropatías y neuropatías. Esto ocurre debido a que, en estas células, los transportadores de glucosa no dependen de la acción de la insulina para que la glucosa ingrese la célula, por lo tanto, en condiciones de hiperglucemia crónica, esos tejidos reciben un mayor aporte de glucosa y, por ende, tienen mayor susceptibilidad a sufrir daño por estrés como el cerebro (Ramakrishna et al., 2008).

De este modo, se hace crucial, evaluar la presencia de daño oxidante en el cerebro y de manera particular en los diferentes núcleos del hipotálamo.

Los antioxidantes empleados en el presente estudio demostraron que, en las dosis y tiempos administrados, pueden mejorar la condición diabética de manera parcial. Se sugiere que la curcumina y el EAE pueden tener un mayor efecto benéfico si el tratamiento se prolonga y/o se aumentan las dosis.



**Figura 3.** Modelo de integración de resultados. La administración de STZ (70 mg/kg) al 2 día de edad (2n) y el consumo de una bebida endulzada con azúcar al 10 % (SSB10%) genera un modelo de estudio de DM2. El modelo se caracteriza por presentar hiperglucemia en ayuno, resistencia a la insulina, concentración baja de insulina, estrés oxidante, aumento en la expresión de NPY y disminución de POMC en el ARC, que en conjunto favorecen al establecimiento y persistencia de la hiperfagia,. Ningún tratamiento logró controlar la hiperfagia, sin embargo, sí regularon la glucemia. Sólo la la curcumina y el EAE disminuyen la expresión de NPY en el ARC sin que esto tenga efecto sobre la hiperfagia. Además la curcumina disminuyó el estrés oxidante.

## **CONCLUSIONES**

La administración de 90 mg de STZ/kg de peso corporal en ratas macho o hembras, promueve la aparición de signos y síntomas característicos de la DM, como hiperglucemia crónica, hiperfagia, poca ganancia de peso corporal. Sin embargo, induce una mortalidad de más del 90 % en los animales.

El modelo más apropiado para estudiar la DM2 y la hiperfagia, es en ratas macho, mediante la administración de STZ (70 mg/kg PC) al 2° día de edad y agua azucarada al 10 % proporcionada durante un periodo temporal (4 a 7 semanas). Este modelo presenta hiperglucemia crónica, moderada resistencia a la insulina, concentraciones bajas de insulina, estrés oxidativo, hiperfagia, aumento en la expresión de NPY y disminución de POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo.

La curcumina y el EAE son antioxidantes con mayor potencial para promover cambios en la expresión de neuropéptidos que regulan el apetito sin modificar la hiperfagia diabética. La curcumina, además, puede reducir el estrés oxidante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almazán Gregorio y Bahena Cuevas (2017). Expresión y fosforilación del receptor de insulina post-tratamiento con extracto de ajo envejecido y metformina en un modelo in vivo de diabetes. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.
- American Diabetes Association (2017). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37:1 S81–S90.
- Andrews, Z. B., Liu, Z. W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., Tschöp M. H., Shanabrough M., Cline G., Shulman G. I., Coppola A., Gao X. B., Horvath T. L., and Diano S., (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*, 454: 846–851
- Atsushi Miki, Camillo Ricordi, Yasunaru Sakuma, Toshiyuki Yamamoto, Ryosuke Misawa, Atsuyoshi Mita, Ruth D. Molano, Nosratola D. Vaziri, Antonello Pileggi, Hirohito Ichii (2018). Divergent antioxidant capacity of human islet cell subsets: A potential cause of beta-cell vulnerability in diabetes and islet transplantation. *PlosOne*.
- Arora S. y Anubhuti (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – A review. *Neuropeptides* 40 375–401.
- Barragán-Bonilla MI, (2015). Regulación del nivel del ARNm de enzimas antioxidantes y Neuropeptido Y por extracto de ajo envejecido en hipotálamo de ratas diabéticas (Tesis de Mestría). Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.
- Barragán-Bonilla MI, Mendoza-Bello JM, Aguilera P, Parra-Rojas I, Illades-Aguiar, Ramírez M, Espinoza-Rojo M, (2019). “Combined Administration of Streptozotocin and Sucrose Accelerates the Appearance of Type 2 Diabetes Symptoms in Rats,” *Journal of Diabetes Research*, vol. 2019, Article ID 3791061, 12 pages.
- Barragán-Bonilla MI, Aguilera P, Espinoza-Rojo M, (2015). Aged garlic extract increases neuropeptide y, superoxide dismutase 2, catalase and glutathione peroxidase mRNA levels in hypothalamus of diabetic rats. Meeting of Society for Neuroscience. E.05. Stress and the Brain.
- Barragán BMI, Rodríguez RHA, (2013). Efecto del extracto de ajo envejecido sobre el nivel del mRNA de GLUT1 y GLUT4 en un modelo in vivo de diabetes mellitus (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.
- Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, y Rudich A., (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev* 89: 27–71
- Belgardt BF, y Brüning JC, (2010). CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1212 (2010) 97–113
- Benani A., Troy S., Carmona M., Fioramonti X., Lorsignol A., Leloup C., Casteilla L., Pénicaud L., (2007). Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing. *Diabetes*, 56:152–160.



- Biessels, G.J., Gispen, W.H. (2005). The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiol. Aging* 26, 36 – 41.
- Bhanot A y Shri R (2010). A comparative profile of methanol extracts of *Allium cepa* and *Allium sativum* in diabetic neuropathy in mice. *Pharmacognosy Res.* 2(6):374-84
- Blanco Basilio y Magallón Tapia, (2014). Regulación de GLUT2 por extracto de ajo envejecido en un modelo in vivo de diabetes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.
- Bonner-Weir, D. F. Trent, R. N. Honey, and G. C. Weir, “Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia,” *Diabetes*, vol. 30, no. 1, pp. 64–69, 1981.
- Chang GQ, Karatayev O, Davydova Z, Wortley K, Leibowitz SF, (2005). Glucose injection reduces neuropeptide Y and agouti-related protein expression in the arcuate nucleus: A possible physiological role in eating behavior. *Molecular Brain Research* 135, 69 – 80
- Chau-Van C., Gamba M., Salvi R., Gaillard R. C. y Pralog F. P. 2007. Metformin Inhibits Adenosine 5'-Monophosphate- Activated Kinase Activation and Prevents Increases in Neuropeptide Y Expression in Cultured Hypothalamic Neurons. *Endocrinology* 148(2):507–511
- Cheng AY, Fantus IG, (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus, *CMAJ* 175 213–226.
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarh DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S (2004) Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145:2607–2612
- De la Cruz Concepción B., Barrera Navarrete P., (2014). Efecto del extracto de ajo envejecido sobre la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3 en cerebro de ratas diabéticas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.
- Del Toro-Equihua, R. Velasco-Rodríguez, R. López-Ascencio, and C. Vásquez, “Effect of an avocado oil-enhanced diet (*Persea americana*) on sucrose-induced insulin resistance in Wistar rats,” *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 24, no. 2, pp. 350–357, 2016.
- Diano S, Lio ZW, Jeong JK, Dietrich MO, Ruan HB, Kim E, Suyama S, Kelly K, Gyengesi E, et al., (2012). Peroxisome proliferation-related ROS control sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat Med.* 17(9): 1121–1127.
- Diano Sabrina (2013). Role of Reactive Oxygen Species in Hypothalamic Regulation of Energy Metabolism. *Endocrinol Metab*, 28:3-5
- Diéguez C, Vazquez MJ, Romero A, López M, Nogueiras R, (2011). Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins. *Neuroendocrinology.* 94:1–11
- Dong J, Peeters TL, Smet B, Moechars D, Delporte C, Vanden Berghe P, Coulie B, Tang M, and Depoortere I, (2006). Role of endogenous ghrelin in the

hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology* 147(6): 2634–2642.

- Dolinsky VW1, Chan AY, Robillard Frayne I, Light PE, Des Rosiers C, Dyck JR (200). Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. *Circulation.* 31;119(12):1643-52. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.787440.
- Drougard A., Fournel A., Valet P., and Knauf C., (2015) Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Frontiers in Neuroscience*, 9 (56):1-12.
- Eleazu CO, K. C. Eleazu, S. Chukwuma, and U. N. Essien, (2013). “Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans,” *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, vol. 12, no. 1, p. 60,
- Evans J., et al., 2002. Oxidative Stress and Stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews.* 23 (5): 599-622.
- Federación Internacional de Diabetes (Ed.) (2017). *Atlas de la Diabetes de la FID*, Séptima ed.
- Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. (1998). *Farmacología humana*. 3ª edic.. MASSON S. A., Barcelona.
- Franklin JL, M. Mirzaei, T. A. Wearne et al., “Quantitative shotgun proteomics reveals extensive changes to the proteome of the orbitofrontal cortex in rats that are hyperactive following withdrawal from a high sugar diet,” *Proteomics*, vol. 16, no. 4, pp. 657–673, 2016.
- Fu M, Li X, Zhang M, Xian Y, (2002). Increased expression of neuropeptide Y and its mRNA in STZ-diabetic rats. *Chin Med J (Engl)*, 115(5):690-5.
- Gehlert DR, (2004). Introduction to the reviews on neuropeptide Y. *Neuropeptides.* 38 135–140
- Gericke MT, Schröder T, Kosacka J, Nowicki M, Klöting N, Spanel-Borowski K, (2011). Neuropeptide Y impairs insulin-stimulated translocation of glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes through the Y1 receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 348 27–32
- German JP, Wisse BE, Thaler JP, Oh-I S, Sarruf DA, Ogimoto K, Kaiyala KJ, Fischer JD, Matsen ME, Taborsky GJ, Schwartz MW, and Morton GJ, (2010). Leptin Deficiency Causes Insulin Resistance Induced by Uncontrolled Diabetes. *Diabetes*, 59:1626–1634.
- Grayson BE, Seeley RJ, and Sandoval DA, (2013). Wired on sugar: the role of the CNS in the regulation of glucose homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience.* Vol. 14: 24-37.
- Gutowski M, and Kowalczyk S. (2013). A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Act. Biochimica Pol.* 60:1 1-16
- Hahn T, Breininger J, Baskin D, and Schwartz M, (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neurosci.* 1, 271–272
- Harriette CJ, (2014). *Behavioral Neuroscience for the Human Services: Foundations in Emotion, Mental Health, Addiction, and Alternative Therapies.*

Part 2, Cap11. Brain Structure: Larger (visible to the human eye). Oxford University Press, 73-83

- Havel PJ, Hahn TM, Sindelar DK, Baskin DG, Dallman MF, Weigle DS, and Schwartz MW, (2000). Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the hypothalamic melanocortin system and muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *Diabetes*. 49: 244-252.
- Havel P, et al. 1998. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: revers by insulin. *Am. J. Physiol*, 274, R1482-R1491
- Hsieh YS, Yang SF, Chiou HL, Kuo DY, (2006). Activations of c-fos/c-jun signaling are involved in the modulation of hypothalamic superoxide dismutase (SOD) and neuropeptide Y (NPY) gene expression in amphetamine-mediated appetite suppression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212, 99–109
- Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, y Oikawa S, (2002). Role of Ghrelin in Streptozotocin-Induced Diabetic Hyperphagia. *Endocrinology* 143(12):4934–4937
- Ivonne CO, G. Ceballos, R. Medina-Santillan, R. Medina-Navarro, A. M. Guzman-Grenfell, and J. J. Hicks, “Oxidation by reactive oxygen species (ROS) alters the structure of human insulin and decreases the insulin-dependent D-glucose-C14 utilization by human adipose tissue,” *Frontiers in Bioscience*, vol. 10, no. 1-3, pp. 3127–3131, 2005.
- Jaillard T., Roger M., Galinier A., Guillou P., Benani A., Leloup C., Casteilla L., Pénicaud L., Lorsignol A., (2009) Hypothalamic Reactive Oxygen Species Are Required for Insulin-Induced Food Intake Inhibition: An NADPH Oxidase–Dependent Mechanism. *Diabetes*, 58: 1544-1549.
- Jing, Y. H., Chen, H. K., Kuo, P. C., Pao, C. C., Chen, J. K. (2013). Neurodegeneration in Streptozotocin-induced diabetic rats is attenuated by treatment with resveratrol. *Neuroendocrinology*. 98 116-127.
- Johnson J. A., Johnson Delinda A., Kraft A. D., Calkins MJ, Jakel RJ, Vargar MR, Chen PC, (2008). The Nrf2-ARE Pathway: An Indicator and Modulator of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 1147: 61–69.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2001) Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50:2438–2443
- Kataoka M, Y. Kawamuro, N. Shiraki et al., “Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 430, no. 3, pp. 1103–1108, 2013.
- Kanarek RB, and R. Marks-Kaufman, “Developmental aspects of sucrose-induced obesity in rats,” *Physiology & Behavior*, vol. 23, no. 5, pp. 881–885, 1979.
- Kohda K., Goda H., Itoh K., Samejima K., Fukuuchi T., (2013). Aged Garlic Extract Reduces ROS Production and Cell Death Induced by 6-Hydroxydopamine through Activation of the Nrf2-ARE Pathway in SH-SY5Y Cells. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 31-40.
- Kaur Gagandeep, Padiya Raju, Adela Ramu, Putcha Uday K., Reddy G. S., Reddy B. R., Kumar K. P., Chakravarty Sumana, Banerjee Sanjay K. (2016).

Garlic and Resveratrol Attenuate Diabetic Complications, Loss of  $\beta$ -Cells, Pancreatic and Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Frontiers in Pharmacology*. 7:360 DOI=10.3389/fphar.2016.00360.

- Khalaf A. J. y Whitford D. L. (2010) The use of complementary and alternative medicine by patients with diabetes mellitus in Bahrain: a cross-sectional study. *BMC Complementary & Alternative Medicine*.10:35 1-5
- Kim JD, Leyva S, and Diano S, (2014). Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Frontiers in Physiology*. 5: 480 1-7
- Kim EM, Grace MK, Welch CC, Billington CJ, Levine AS, (1999). STZ-induced diabetes decreases and insulin normalizes POMC mRNA in arcuate nucleus and pituitary in rats. *Am J Physiol*. 276(5 Pt 2):R1320-6.
- Kohno D, Suyama S., Yada, T., 2008b. Leptin transiently antagonizes ghrelin and long-lastingly orexin in regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in neuropeptide Y neurons of the arcuate nucleus. *World J. Gastroenterol*. 14, 6347–6354.
- Kook S., Kim G. H., y Choi K. (2009) The Antidiabetic Effect of Onion and Garlic in Experimental Diabetic Rats: Meta-Analysis. *J Med Food*. 12 (3) 552-560
- Kojima M., y Kangawa K., (2005). Ghrelin: Structure and function. *Physiological Reviews* 85: 495–522.
- Kuhad, A. y Chopra K., (2007). Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: Behavioral and biochemical evidences. *European Journal of Pharmacology*, 576: 34-42.
- Kuhad A., Sethi R., Chopra K., (2008). Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sciences*, 83: 128-134.
- Lana, F. Rodríguez-Artalejo, and E. Lopez-Garcia, “Consumption of sugar-sweetened beverages is positively related to insulin resistance and higher plasma leptin concentrations in men and nonoverweight women,” *The Journal of Nutrition*, vol. 144, no. 7, pp. 1099–1105, 2014.
- Le May, K. Chu, M. Hu et al., “Estrogens protect pancreatic  $\beta$ -cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 24, pp. 9232–9237, 2006.
- Leedom LJ, and Meehan WP, (1989). The psychoneuroendocrinology of diabetes mellitus in rodents. *Psychoneuroendocrinology* 14, 275–294
- Leloup C., Magnan C., Benani A., Bonnet E., Alquier T., Offer G., Carriere A., Périquet A., Fernandez Y., Ktorza A., Casteilla L., Pénicaud L. (2006). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Are Required for Hypothalamic Glucose Sensing. *Diabetes*, 55, 2084-2090
- Malva JO, Xapelli S, Baptista S, Valero J, Agasse F, Ferreira R, Silva AP, (2013). Multifaces of neuropeptide Y in the brain – Neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. *Neuropeptides* 46 299–308
- Maletínská, L., Maixnerová, J., Matysková, R., Haugvicová, R., Sloncová, E., Elbert, T., Slaninová, J., Zelezná, B., 2007. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur. J. Pharmacol*. 559, 109–114.
- Marathe PA, R. R. Parekar, S. P. Shinde, and N. N. Rege, “A split dose regimen of streptozotocin to induce diabetes in a neonatal rat model,” *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 38, no. 6, pp. 432-433, 2006.

- Mao F, Xiujun L, Min Z, and Yang X, (2002). Increased expression of neuropeptide Y and its mRNA in STZ-diabetic rats. *Chinese Medical Journal*. 115 (5): 690-695
- Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J, (2012). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 12, 5–18.
- Meyts P. (2016). *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*. National Library of Medicine, National Institutes of Health, 1-22.
- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A, (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neurosciences*. 36:10 587-597
- Morrison CD, Morton GJ, Niswender KD, et al. 2005. Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: E1051–E1057.
- Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenhom, Rooyackers O, Zhou G, Williamson J, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, y Goodyear LJ., (2002). Metformin Increases AMP-Activated Protein Kinase Activity in Skeletal Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 51, 2074-2081
- Nagelová V, Pirník Z, Zelezna V, Malentínská L, (2014). CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide specific binding sites in PC12 cells have characteristics of CART peptide receptors. *Brain Research* 1547, 16-24.
- Nahdi, A., John, A., & Raza, H. (2017). Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 7054272.
- Nelson, David L., Michael M. Cox, (2005). *Lehninger, Principles of biochemistry* 4<sup>a</sup> ed. W. H. Freeman and Company.
- Niedowicz, D.M., Daleke, D.L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem. Biophys.* 43, 289–330.
- Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG Jr, Seeley RJ, and Schwartz MW. (2005). Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52: 227–231, 2003.
- Nir, D. A. Melton, and Y. Dor, “Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 9, pp. 2553–2561, 2007.
- Obici S, Feng Z, Karkanias G, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. 2002 Jun; 5(6):566-72. print
- Onoue T, Goto M, Tominaga T, Sugiyama M, Tsunekawa T, Hagiwara D, Banno R, Suga H, Sugimura Y, Arima H, (2016). Reactive oxygen species mediate insulin signal transduction in mouse hypothalamus. *Neuroscience Letters* 619, 1–7
- Onken, B., Driscoll, M., 2010. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK,

LKB1, and SKN-1. PLoS ONE 5, e8758.

- Osawa T, and Kato Y. (2005). Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann. N Y Acad Sci.* 1043: 440-51
- Palsamy, P. and Subramanian, S. (2008) Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 62, 598–605.
- Patil MA, Suryanarayana, U. K. Putcha, M. Srinivas, and G. B. Reddy, “Evaluation of neonatal streptozotocin induced diabetic rat model for the development of cataract,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, 10 pages, 2014.
- Patel BM, S. Raghunathan, and U. Porwal, “Cardioprotective effects of magnesium valproate in type 2 diabetes mellitus,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 728, no. 728, pp. 128–134, 2014.
- Parihar P, Shetty R, Ghafourifar P, Parihar MS (2016). Increase in oxidative stress and mitochondrial impairment in hypothalamus of streptozotocin treated diabetic rat: Antioxidative effect of *Withania somnifera*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016 Jan 22;62(1):73-83.
- Parker JA, y Bloom SR, (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 63: 18-30
- Pick, J. Clark, C. Kubstrup et al., “Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat,” *Diabetes*, vol. 47, no. 3, pp. 358–364, 1998.
- Prasad S, Sajja RK, Naik P, Cucullo L, (2014). Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. *J Pharmacovigil.* 2(2):125.
- Pessler D, Rudich A y Bashan N, (2010). Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter. *Diabetologia*, 44: 2156-2164.
- Purkayastha, S., and Cai, D. (2013). Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. *Mol. Metab.* 2, 356–363.
- Rodriguez EM, Blazquez JL, and Guerra M, (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31, 757–776.
- Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). OXIDATIVE STRESS, INSULIN SIGNALING AND DIABETES. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(5), 567–575.
- Ramírez S1, Claret M (2015). Hypothalamic ER stress: A bridge between leptin resistance and obesity. *FEBS Lett.* 2015 Jun 22;589(14):1678-87. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.025.
- Ramakrishna, Vadde & Jaikhani, Rama. (2008). Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta diabetologica*. 45. 41-6. 10.1007/s00592-007-0018-3.
- Richard J. Alsop, Alexander Dhaliwal Maikel and C. Rheinstädter (2017). Curcumin Protects Membranes through a Carpet or Insertion Model Depending on Hydration. *American Chemical Society*. 33348516-8524.

- Rouse M, Younès A, & Egan JM, (2014). Resveratrol and curcumin enhance pancreatic  $\beta$ -cell function by inhibiting phosphodiesterase activity. *The Journal of endocrinology*, 223(2), 107–117. doi:10.1530/JOE-14-0335
- Rashid K1, Sil PC2. (2014) Curcumin enhances recovery of pancreatic islets from cellular stress induced inflammation and apoptosis in diabetic rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Feb 1;282(3):297-310. doi: 10.1016/j.taap.2014.12.003.
- Schmidt SL, y Hickey MS, (2009). Regulation of Insulin Action by Diet and Exercise. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol 29, No 5, 274-284.
- Schwartz, M. et al (1997). Leptin increases hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46, 2119–2123.
- Schwartz MW, Woods S, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG, (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*. 404, 661-671.
- Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50:227–232
- Sindelar, D. et al. (1999). Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes* 48, 1275-1280
- Sindelar DK, Mystkowski P, Marsh DJ, Palmiter RD, (2002). Attenuation of diabetic hyperphagia in neuropeptide Y-deficient mice. *Diabetes*, 51: 778-783.
- Sipols AJ, Baskin DG, and Schwartz MW, (1995).Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44, 147–151
- Simpson SH, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Eurich DT, Johnson JA, Dose–response relation between sulfonylurea drugs and mortality in type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study. *CMAJ*, 174(2):169-74
- Stevanovic D, Janjetovic K, Misirkic M, Vucicevic L, Sumarac DM, Micic D, Starcevic V, y Trajkovic V, (2012). Intracerebroventricular Administration of Metformin Inhibits Ghrelin-Induced Hypothalamic AMP-Kinase Signalling and Food Intake. *Neuroendocrinology*, 96:24–31
- Storozhevykh, T. P., Senilova, Y. E., Persiyantseva, N. A., Pinelis, V. G., and Pomytkin, I. A. (2007). Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. *BMC Neurosci*. 8:84.
- Sung TS, J. H. La, T. M. Kang, T. W. Kim, and I. S. Yang, “Visceral hypersensitivity and altered colonic motility in type 2 diabetic rat,” *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, vol. 21, no. 4, pp. 581–588, 2015.
- 
- Suwattanee Kooptiwut, Suchada Kaewin, Namoiy Semprasert, Jatuporn Sujitjoon, Mutita Junking, Kanchana Suksri & Pa-thai Yenchitsomanus (2018). Estradiol Prevents High Glucose-Induced  $\beta$ -cell Apoptosis by Decreased BTG2 Expression. *Scientific Reports* volume 8, Article number: 12256.
- Takasu, I. Komiya, T. Asawa, Y. Nagasawa, and T. Yamada, “Streptozocin- and alloxan-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and DNA fragmentation in pancreatic islets:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as mediator for DNA fragmentation,” *Diabetes*, vol. 40, no. 9, pp. 1141–1145, 1991.

- Tangvarasittichai, “Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus,” *World Journal of Diabetes*, vol. 6, no. 3, pp. 456–480, 2015.
- Thorel, V. Népote, I. Avril et al., “Conversion of adult pancreatic  $\alpha$ -cells to  $\beta$ -cells after extreme  $\beta$ -cell loss,” *Nature*, vol. 464, no. 7292, pp. 1149–1154, 2010.
- Thomson M., Al-Amin Z. M., Al-Qattan K. K., Shaban L. H., y Ali M. (2007). Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of garlic (*Allium sativum*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Diabetes & Metabolism*. 15: 108-115
- Thomson M, Al-Qattan KK, Divya JS, y Ali M, (2016). Anti-diabetic and anti-oxidant potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin-induced diabetic rats *BMC Complementary and Alternative Medicine*; 16:17, 1-9
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Rivera del Valle N, y Huang P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox signaling*. 10:9 1343-1374.
- Thota, R. N., Dias, C. B., Abbott, K. A., Acharya, S. H., & Garg, M. L. (2018). Curcumin alleviates postprandial glycaemic response in healthy subjects: A cross-over, randomized controlled study. *Scientific reports*, 8(1), 13679. doi:10.1038/s41598-018-32032-x
- Thorens B, G. C. Weir, J. L. Leahy, H. F. Lodish, and S. Bonner-Weir, “Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 17, pp. 6492–6496, 1990.
- Verspohl EJ, (2012). Novel pharmacological approaches to the treatment of type 2 diabetes, *Pharmacol. Rev.* 64 188–237.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F, (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 18, 158 – 168
- Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen P, Kristensen P, (1999). Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res*. 818, 499–509.
- Wang L, Saint-Pierre DH, and Tache Y, (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 325: 47–51.
- Williams G, Bing G, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH, (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes. *Physiology & Behavior*. 74: 683–701.
- Wilson JL, and Enriori PJ, (2015). A talk between fat tissue, gut, pancreas and brain to control body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 418: 108 - 119.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, et al. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505
- Xu AW, Ste L, Kaelin CB, and Barsh GS. 2007. Inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 in proopiomelanocortin (*Pomc*) neurons causes



decreased pomc expression, mild obesity, and defects in compensatory refeeding. *Endocrinology* 148: 72–80.

- Yang, H., Jin, X., Kei Lam, C.W., Yan, S.-K. (2011). Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC.* 49, 1773–1782
- Yu Y, South T, Wang Q, Huang X, (2008). Differential expression of hypothalamic CART mRNA in response to body weight change following different dietary interventions. *Neurochem. Int.* 52, 1422–1430.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167–1174.
- Zorzano A., y Claret M., (2015). Implications of mitochondrial dynamics on neurodegeneration and on hypothalamic dysfunction. *Front Aging Neurosci.* 7: 101.

Anexo 1. Protocolo 32/17 con No. de oficio: CICUAL/SO/VI/22617/028/2017

**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía**  
Manuel Velasco Suárez



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



No. Oficio: CICUAL/SO/VI/22617/028/2017  
Ciudad de México a 9 de septiembre del 2017

DRA. PENELOPE AGUILERA  
LABORATORIO DE PATOLOGÍA  
VASCULAR CEREBRAL  
PRESENTE

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) determinó que el proyecto titulado: "EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE MOLÉCULAS QUE REGULAN EL APETITO Y LA HOMEOSTASIS DE GLUCOSA, EN DIABETES" como parte del protocolo 32/17 a cargo de la DRA. MÓNICA ESPINOZA cumple con las Normas Nacionales de Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM 062 ZOO 1999) y se autoriza la utilización de animales acorde a lo descrito en el protocolo en cantidad y métodos.

Se extiende la presente para los fines que al interesado convenga.

**MIEMBROS DEL COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO (CICUAL)**

Dra. Ma. Lucinda Aguirre Cruz  
PRESIDENTE

M en C. César A. Rodríguez Balderas  
SECRETARIO

Dr. Joaquín Manjarrez Marmolejo  
VOCAL

Dra. Laura Adalid Peralta  
VOCAL