

## Sensibilidad a la insulina en ovejas prepúberes con alimentación normal y con restricción alimenticia<sup>#</sup>

Insulin sensitivity in prepubertal growing ewes with normal and restricted alimentation

S E Recabarren<sup>1\*</sup>, A Lobos, P Muñoz<sup>1</sup>, M Calvillán<sup>1</sup>, J Parilo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

### SUMMARY

It has been shown that fasting in growing ewes is associated with insulin resistance as an adaptative mechanism to the low energy supply. Food restriction is another experimental or natural situation that may occur for growing ewes where energy supply is under the requirement for growth. Insulin sensitivity may also change as a physiological adaptation to the shortage of food. The aim of the present study was to assess if insulin sensitivity decreases during food restriction in growing ewes. Insulin sensitivity was assessed by the intravenous glucose tolerance test (IVGTT). A glucose solution (300mg/kg body weight, 50% solution) was infused over two minutes into five normal growing 26-week old ewes and five 26 week-old ewes that had been restrictively fed from the age of 20 to 26 weeks. Blood samples were collected from the jugular vein of each ewe by an indwelling jugular vein catheter 15 and 10 min before and at 0, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 23, 25, 27 and 30 min after the initiation of the glucose infusion, and plasma glucose and insulin were measured by RIA. To determine the insulin sensitivity index (ISI), glucose and insulin concentrations were analyzed using the Matsuda and De Fronzo's formula (ISI-Composite). Basal, stimulated and incremental area under the curve of insulin and the glucose utilization constants were also calculated. ISI-C was lower in food-restricted female sheep ( $636.43 \pm 125.66$ ) compared to normal growing females ( $1528.18 \pm 297.61$ ), ( $P < 0.05$ ). Concordant with this, incremental area under the curve of insulin was lower ( $290.54 \pm 79.45$  ng/ml/30 min) in control than in food-restricted females ( $642.16 \pm 140.04$  ng/mL/30 min,  $P < 0.05$ ). The glucose utilization constant did not differ between groups. Results suggest that food restriction induces insulin resistance as an adaptative process to the shortage of food in growing female sheep.

*Palabras clave:* insulina, resistencia, sensibilidad, ovejas.

*Key words:* insulin resistance, insulin sensitivity, endovenous glucose tolerance test, ewes, puberty.

### INTRODUCCION

Todo organismo viviente necesita energía para las funciones vitales. Una parte importante del aporte energético diario se ocupa en el metabolismo y en la producción de calor. En condiciones basales, cuando no existen demandas extras (crecimiento, preñez o lactancia), el equilibrio energético corresponde al balance entre el aporte y el gasto. Si el aporte se reduce respecto del gasto mínimo diario, el desbalance que se genera obliga al animal a obtener energía de las fuentes de almacenamiento constituidas por las grasas y proteínas. Dado que entre las funciones vitales que más demandan energía la reproducción aparece como una de las más importantes, un desbalance energético repercute de inmediato en ella. Esta relación es particularmente importante durante el desarrollo pre-

puberal, con los efectos ya demostrados sobre el eje gonadal: disminución de la secreción de GnRH/LH y retraso en la pubertad.

Los resultados adversos en la reproducción como consecuencia del desbalance energético, tanto de largo plazo como de corta duración, se conocen, pero los mecanismos que los integran no están completamente definidos. Una alternativa para explicar esta relación la constituye la insulina plasmática. La insulina es una hormona que responde rápidamente a los cambios en el aporte energético y, por lo tanto, podría constituirse en una señal metabólica para el hipotálamo en su función reguladora del apetito como en su función reguladora de la reproducción (Schwartz y col 1992). La insulina se difunde rápidamente desde la sangre al cerebro, a través de la barrera hematoencefálica, y se une a receptores ubicados en neuronas que comprenden las zonas de regulación del apetito y de la secreción de GnRH (Miller y col 1998). Con el fin de respaldar la hipótesis de la insulina como indicadora del estatus metabólico de la hembra en crecimiento, en trabajos anteriores hemos analizado la sensi-

Aceptado: 29.03.2005

<sup>#</sup> Financiado por Proyecto DIUC 201.153.012.1

E-mail: srecabar@udec.cl

bilidad periférica a la insulina con el test de tolerancia a la insulina (ITT) en condiciones experimentales de ayuno (Recabarren y col 2000). Los resultados mostraron que la sensibilidad tisular a la insulina disminuye drásticamente durante el ayuno en ovejas prepúberes y que después de 24 horas de realimentación la sensibilidad no se recupera totalmente (Recabarren y col 2000). La disminución en la sensibilidad tisular periférica a la insulina significa que durante el ayuno se desarrolla un estado de resistencia insulínica. La resistencia insulínica (RI) se define como la incapacidad biológica de la insulina endógena o exógena para aumentar la captación de glucosa y su utilización (Lebovitz 2001).

El ayuno prolongado es una situación extrema, cuya información experimental sobre el comportamiento metabólico podría ser no extrapolable a períodos de bajo consumo de alimentos, con los cuales se puede enfrentar la hembra en crecimiento y que repercute en el eje reproductivo.

Por lo tanto, el presente trabajo se dirigió a determinar el efecto de una restricción alimenticia sobre la sensibilidad periférica a la insulina cuantificada mediante el test de tolerancia a la glucosa endovenosa (TTGEV) en ovejas prepúberes después de seis semanas de restricción alimenticia.

## MATERIAL Y METODOS

*Manejo general de los animales.* Se utilizaron 10 borregas prepúberes Suffolk Down, nacidas en agosto, provenientes de la Unidad de Producción Ovina de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción. Las hembras se destetaron a los 3 meses de edad y se alimentaron con pradera natural y suplementadas con alimento peletizado (Novillina, Champion). A las 20 semanas de edad las borregas se separaron al azar en dos grupos: uno control y el otro experimental. Las borregas del grupo control ( $n = 5$ ,  $23,6 \pm 1,1$  kg peso vivo) se alimentaron *ad libitum*, mientras que a las borregas del grupo experimental ( $n = 5$ ,  $23,2 \pm 0,5$  kg peso vivo) se les limitó la ingesta del alimento, alimentándolas con una cantidad diaria de alimento peletizado equivalente aproximadamente al 2% del peso corporal. Este procedimiento se mantuvo por 6 semanas, hasta las 26 semanas de edad.

Cuarenta y ocho horas antes del inicio del TTGEV, las borregas se trasladaron a la sala de experimentación, para la cateterización de una vena yugular de acuerdo al método descrito por Recabarren y col (1995). El catéter (Arrow, 18 g), conectado a una llave de tres pasos, se utilizó para la infusión de glucosa y para la colección de las muestras de sangre. Los catéteres se mantuvieron con suero heparinizado (500 UI/mL) para evitar la formación de coágulos. Se procedió a muestreos sanguíneos de acostumbamiento durante el día previo para reducir los riesgos de estrés. El alimento sobrante se retiró a las 20 horas

del día anterior al test, para permitir un ayuno de 12 horas previo a los experimentos.

*Test de tolerancia a la glucosa endovenosa.* El test de tolerancia a la glucosa endovenosa consistió en la infusión de una solución de glucosa estéril 50% a una dosis de 300 mg/kg de peso vivo en 2 minutos. Se colectaron muestras de sangre a los 15 y 10 minutos antes de la infusión y a los 0, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 20, 23, 25, 27 y 30 minutos después del inicio de la infusión para las mediciones de insulina y glucosa sanguínea. Las muestras obtenidas antes y al tiempo 0 se utilizaron para calcular las concentraciones de insulina y glucosa plasmática basal. Las muestras de sangre se recibieron en tubos de vidrio heparinizados para la medición de insulina y en tubos de vidrio heparinizados y fluorados para la medición de glucosa conservados en hielo. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1000 g por 15 min a 4° Celsius, y el plasma se conservó congelado a -20° Celsius hasta las determinaciones de insulina y glucosa plasmática.

*Medición de glucosa e insulina.* Las concentraciones plasmáticas de insulina se determinaron por RIA con kits comerciales (Insulin Count-a-Count, DPC, USA) validado en el laboratorio para ovejas. La radiactividad se cuantificó en un gammaespectrómetro LKB RIA GAMMA 1271 (Wallac Oy, Finlandia). El nivel mínimo de detectabilidad definido como el 90% del buffer control fue de 3  $\mu$ U/mL, con un coeficiente de variación intraensayo e interensayo de 5 y 8% respectivamente en el rango de 5 a 300  $\mu$ U.

La glucosa se midió con kits comerciales (Wiener Lab, Chile) mediante el método de la glucosa oxidasa con medición de la absorbancia a 505 nm en espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy, USA). El coeficiente intra e interensayo fue menor al 2 y 5% respectivamente.

*Cálculo del índice de sensibilidad a la insulina.* Para el cálculo del índice de sensibilidad a la insulina se utilizó la fórmula descrita por Matsuda y De Fronzo (1999), donde:

$$\text{ISI-Composite} = 10000 / (\text{Promedio concentración glucosa basal} \times \text{Promedio concentración insulina basal}) \times (\text{Promedio concentración glucosa 0-30 min} \times \text{Promedio concentración de insulina 0-30 min})$$

Además, se determinó el área bajo la curva de respuesta de insulina (AUC, ng/ml/30min) como la diferencia entre el área bajo la curva de las concentraciones basales de insulina y el área bajo la curva de insulina estimulada durante el TTGEV, con la fórmula del trapecioide y la tasa de disponibilidad de la glucosa (kg, % por min) mediante la pendiente de la caída de glucosa entre los 10 y 20 minutos postadministración de glucosa.

*Análisis estadístico.* Los datos de glucosa e insulina basal, la sensibilidad a la insulina (ISI-Composite), el área bajo la curva y la constante de utilización de glucosa se analizaron, en primer lugar, por homogeneidad de varianza,

con el test de Bartlett y luego con el test de “t” no pareado con el programa computacional GBStat v.6. Se consideró un  $P < 0,05$  como una diferencia estadísticamente significativa. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  error estándar.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los pesos corporales promedio, la glucosa plasmática y la insulina plasmática basal de cada grupo a las 26 semanas de edad (después de seis semanas de restricción alimenticia en el grupo experimental). El peso de las borregas del grupo control fue mayor que el de las borregas del grupo experimental ( $P < 0,05$ ). La glucosa plasmática fue menor ( $P < 0,05$ ) en las ovejas con restricción alimenticia que en las controles, mientras que la concentración de insulina plasmática fue menor en las ovejas controles que en las experimentales.

En la figura 1 se muestran las concentraciones plasmáticas promedio de glucosa e insulina durante el TTGEV en ambos grupos. Se puede observar el aumento en las concentraciones de glucosa como resultado de la infusión de glucosa con un nivel máximo a los 3 minutos. Posteriormente la glucosa plasmática descendió hasta los 30 minutos con una pendiente similar en ambos grupos:  $1,56 \pm 0,47$  y  $1,98 \pm 0,27\%$  por min respectivamente. El grupo restringido exhibió una mayor secreción de insulina en respuesta a la glucosa que en el grupo control. Este tipo de comportamiento determinó que el ISI-C de las borregas experimentales fue de  $636,43 \pm 125,66$  después de seis semanas de restricción alimenticia, mientras que en las borregas controles fue de  $1528,18 \pm 297,61$  ( $P < 0,05$ ) (figura 2). La mayor secreción de insulina en

respuesta a la glucosa se puede reconocer como área bajo la curva de respuesta. El AUC de las borregas experimentales fue de  $642,16 \pm 140,04$  y mayor ( $P < 0,05$ ) que el de las ovejas controles:  $290,54 \pm 79,45$ .

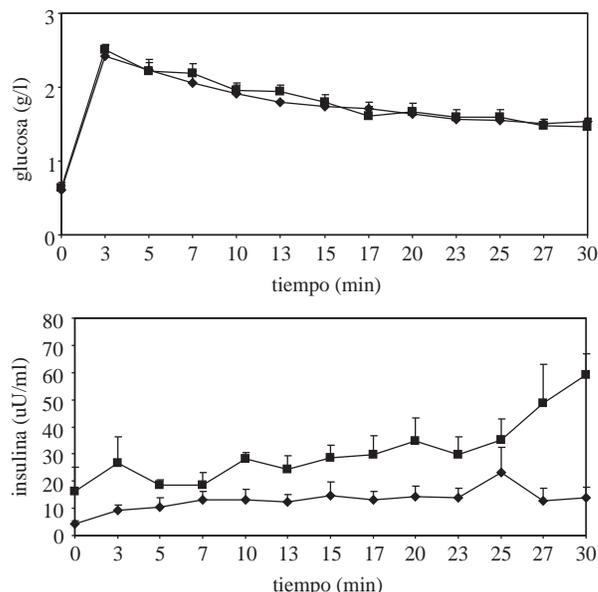


Figura 1. Promedio ( $\pm$  error estándar) de las concentraciones plasmáticas de glucosa (g/l) en borregas controles ( $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ ) y en borregas con restricción alimenticia ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ) a las 26 semanas de edad (panel superior) durante el test de tolerancia a la glucosa endovenosa.

Promedio ( $\pm$  error estándar) de las concentraciones plasmáticas de insulina ( $\mu$ U/ml) en borregas controles ( $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ ) y en borregas con restricción alimenticia ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ) a las 26 semanas de edad durante el test de tolerancia la glucosa endovenosa.

Mean ( $\pm$  standard error) plasma glucose concentrations (g/l) in control ( $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ ) and food-restricted 26 week-old ewe lambs ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ) during the intravenous glucose tolerance test (upper graph).

Mean ( $\pm$  standard error) plasma insulin concentrations ( $\mu$ U/ml) in control ( $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ ) and food-restricted 26 week-old ewe lambs ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ) during the intravenous glucose tolerance test (lower graph).

Cuadro 1. Promedio ( $\pm$  error estándar) del peso corporal, glucosa plasmática e insulina plasmática en ovejas prepúberes de 26 semanas de edad. El grupo control se alimentó *ad libitum* y al grupo experimental (con restricción alimenticia por 6 semanas, a partir de las 20 semanas de edad) se le ofreció alimento en una cantidad equivalente al 2% del peso corporal.

Mean ( $\pm$  standard error) body weight, plasma glucose and plasma insulin concentrations in prepubertal 26 week old ewes. Control group was fed *ad libitum* and the experimental group was offered food at a level equivalent to the 2% of their body weight for 6 weeks beginning at 20 weeks of age.

	Peso Corporal Body weight Kg	Glucosa Glucose g/l	Insulina Insulin $\mu$ U/ml
Grupo Control Control Group	26,0 $\pm$ 1,04a	0,62 $\pm$ 0,07	4,43 $\pm$ 0,83a
Grupo Experimental Experimental group	20,0 $\pm$ 0,76b	0,64 $\pm$ 0,05	16,36 $\pm$ 8,91c

a, b  $P < 0,01$ .  
a, c  $P < 0,05$ .

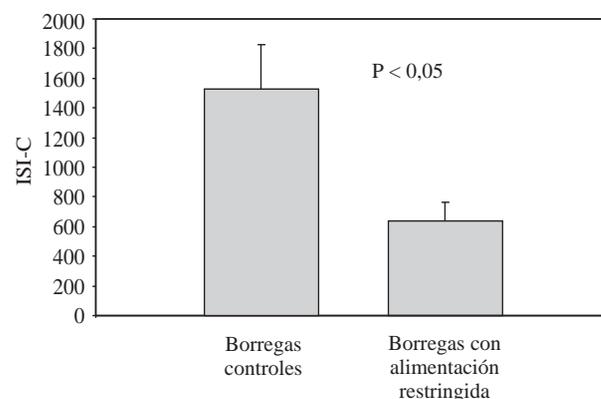
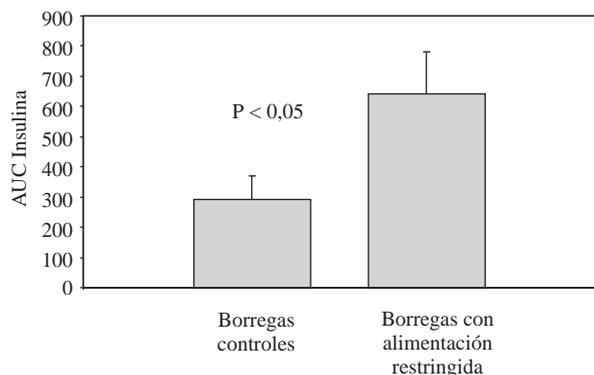


Figura 2. Promedio ( $\pm$  error estándar) del índice de sensibilidad a la insulina (ISI-C) en borregas del grupo control y en borregas con restricción alimenticia.

Mean ( $\pm$  standard error) insulin sensitivity index (ISI-Composite) in control and food-restricted ewe lambs.



**Figura 3.** Promedio ( $\pm$  error estándar) del área bajo la curva de insulina incremental (AUC, ng/ml/30 min) en borregas controles y en borregas con alimentación restringida. El AUC incremental corresponde a la diferencia entre el AUC basal y el AUC de insulina estimulada.

Mean ( $\pm$  standard error) incremental area under the curve of insulin (AUC, ng/ml/30 min) in control and food-restricted ewe lambs. Incremental AUC was calculated as the difference between stimulated and basal AUC of insulin.

## DISCUSION

La restricción alimenticia de ovejas prepúberes por seis semanas conduce a una menor sensibilidad a la insulina con respecto a ovejas controles de la misma edad, lo que sugiere el desarrollo de una resistencia insulínica en ellas. Lo anterior se asocia al aumento en las concentraciones plasmáticas basales de insulina en las borregas con restricción alimenticia que en las borregas controles, indicando que la resistencia insulínica se asocia a una hiperinsulinemia compensatoria.

La presencia de resistencia insulínica también se ha observado durante el ayuno en ovejas prepúberes (Recabarren y col 2000). El objetivo biológico de la RI, tanto durante la restricción alimenticia como durante el ayuno, sería favorecer la disponibilidad de glucosa para los tejidos no insulino-dependientes, en particular, el cerebro. Una situación parecida se produce durante la preñez, en la cual los tejidos maternos insulino-dependientes, como el músculo esquelético y tejido adiposo, se encuentran en competencia con el feto (Pettersen y col 1993), o durante la lactancia a favor de la glándula mamaria (Vernon y col 1990).

El mecanismo exacto y cuáles son las sustancias involucradas en el desarrollo de la RI en estos estados fisiológicos aún no están claros. Es posible que la borrega, a consecuencia de la falta de energía disponible en cantidad suficiente para el gasto energético derivado del crecimiento, comience a movilizar parte de la grasa almacenada anteriormente, liberándose ácidos grasos libres desde los triglicéridos del tejido adiposo. Estos ácidos grasos libres son los que podrían desencadenar la RI, fun-

damentalmente en el tejido muscular e hígado, actuando de manera similar a como lo hacen en la obesidad, ejerciendo su efecto sobre la actividad tirosina-kinasa del receptor de insulina, contribuyendo así a un estado de RI post-receptor (Boden 1996, Boden 2003). Como consecuencia de este estado de RI se produce un aumento compensatorio de insulina, lo que llevaría a una hiperinsulinemia. Es también posible que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), una citoquina proinflamatoria que se sintetiza y se secreta desde los adipositos (Kern y col 1995), tenga un rol ya sea paracrino o autocrino en el control de la función del adiposito. Por un lado, se ha establecido que promueve la lipólisis y que, por otro, disminuye la actividad de la lipoproteinlipasa (LPL) (Hauner y col 1995, Kern y col 1995) y reduce la expresión de los transportadores de ácidos grasos libres en el tejido adiposo (Memon y col 1998), con lo cual disminuye la lipogénesis. El TNF $\alpha$  puede entonces actuar en el adiposito desviando el metabolismo lipídico desde la acumulación hacia la reducción en el pool de triglicéridos, lo cual representaría uno de los mecanismos por los cuales se reduce la masa de tejido adiposo total. Por otro lado, no se puede descartar que en el proceso de generación de la resistencia insulínica de la restricción alimenticia participen otros péptidos derivados del adiposito como la adiponectina. La adiponectina es una citokina que se ha relacionado con la resistencia insulínica, pero más bien con el aumento de adiposidad (Ravussin 2002).

Sin embargo, la resistencia insulínica que se presenta durante la restricción alimenticia sería diferente a la que se desarrolla en la obesidad. En la obesidad, hay un aumento de los triglicéridos plasmáticos como consecuencia del aumento de la lipólisis en el adipocito distendido, el cual se hace resistente a la insulina. El aumento de los ácidos grasos libres conduce a una resistencia insulínica, con hiperinsulinemia y euglicemia. Por el contrario, en la resistencia insulínica de la restricción alimenticia de nuestro modelo se presenta hiperinsulinemia con euglicemia o hipoglicemia. Este aumento en las concentraciones plasmáticas de insulina como compensación por la RI produce una disminución en la actividad kinasa del receptor de insulina, probablemente por fosforilación de la serina/treonina del receptor en contraste con la fosforilación de la tirosina (Hotamisligil y col 1994). La estimulación de serinakinasa con la fosforilación de la serina y treonina produce disminución de la actividad del receptor, por lo que, disminuyendo la actividad del receptor, disminuye la sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina (Kahn 1997). La implicación clínica de esto es que cualquier desbalance en un estado de restricción alimentaria se debería a la resistencia *per se* o los efectos crónicos de la hiperinsulinemia compensatoria.

Se ha propuesto que la insulina (Steiner y col 1983) así como otros metabolitos u hormonas serían señales metabólicas que informan al hipotálamo mediante un complejo mecanismo neuroendocrino sobre el estado meta-

bólico de la hembra en crecimiento para modificar la secreción de GnRH (Recabarren 1999, Tanaka y col 2000). Si la insulina fuese una señal interpretativa del estado metabólico, la hiperinsulinemia derivada de la RI sería un medio por el cual las neuronas GnRH podrían interpretar la capacidad metabólica y reproductiva de la hembra y consecuentemente disminuir la secreción de GnRH. Es probable que esta información deba ir acompañada por otras, como ser la leptina. Estudios de nuestro laboratorio muestran que la restricción alimenticia por seis semanas en ovejas prepúberes disminuye significativamente la leptina circulante (Recabarren y col 2004). De tal forma que una hiperinsulinemia asociada a una hipoleptinemia podría ser reconocida por las neuronas GnRH como un estado metabólico no competente con la reproducción. Esto, a su vez, mantendría reprimida la secreción de GnRH y, por ende, el inicio de la pubertad se retrasaría. Por el contrario, una hiperinsulinemia asociada a un aumento de leptina u otros metabolitos y hormonas podría ser desencadenante del inicio de la pubertad (Porte Jr. y col 2002, Foster y Nagatani 1999).

En el hipotálamo de varias especies se ha demostrado la presencia de receptores de insulina (Van Houten y col 1980, Havrankova y col 1981, Landau y col 1983, Schuler y col 1984, Hopkins y Williams, 1997), y en particular en neuronas próximas a las neuronas GnRH (Van Houten y col 1980). Complementando estas observaciones se ha demostrado la presencia de receptores de insulina en neuronas GnRH cultivadas *in vitro* (Olson y col 1995). La administración de insulina directamente en el líquido cefalorraquídeo cerebral de corderos diabéticos restauró la secreción pulsátil de LH, sugiriendo un efecto central sobre la secreción de GnRH (Tanaka y col 2000), aunque no se puede descartar que los efectos de la insulina hayan sido indirectos a través de la modificación en la actividad de otras neuronas relacionadas con la secreción de GnRH (Sahu y col 1995, Porte Jr y col 2002, Kyriaki 2003). Reafirmando lo anterior, se ha demostrado una menor secreción de LH en ratones machos y hembras knockout para el receptor de insulina en el hipotálamo, y un menor conteo de espermios al presentado por el ratón salvaje (Wild-type) (Brüning y col 2000), lo que sugiere un importante rol directo de la insulina a nivel hipotalámico en el control de la secreción de GnRH.

En resumen, el test de tolerancia a la glucosa endovenosa es un método que permite dilucidar la sensibilidad a la insulina en animales experimentales, y reconocer que la restricción alimenticia en ovejas prepúberes está acompañada de resistencia insulínica como un mecanismo homeostático para permitir el uso de la glucosa en tejidos no insulino-dependientes.

## RESUMEN

Se ha demostrado, en borregas en crecimiento, que el ayuno está asociado a resistencia insulínica como un fenómeno adaptativo a la baja ingesta calórica. La restricción alimenticia

es otra situación natural o experimental que puede enfrentar la hembra en crecimiento, en la cual la disponibilidad de energía está por debajo de los requerimientos indispensables para el crecimiento. La sensibilidad a la insulina podría cambiar también como una adaptación fisiológica a la escasez de alimento. El objetivo del presente estudio fue reconocer si la sensibilidad a la insulina disminuye durante la restricción alimenticia de borregas en crecimiento. La sensibilidad a la insulina se evaluó con el test de tolerancia a la glucosa endovenosa (TTGEV). Cinco borregas con crecimiento normal y cinco borregas con restricción alimenticia por seis semanas, a partir de las 20 semanas de edad, se infundieron con una solución estéril de glucosa (300 mg/kg peso corporal, solución al 50%) en dos minutos. Se colectaron muestras de sangre desde la yugular mediante un catéter venoso 15 y 10 minutos antes de la infusión de glucosa, y a los 0, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 23, 25, 27, 30 minutos después del inicio de la infusión en cuyo plasma se midió glucosa e insulina. Las concentraciones de glucosa (g/l) e insulina ( $\mu$ UI/ml) se analizaron con la fórmula de Matsuda y DeFronzo para determinar el índice de sensibilidad a la insulina (ISI-Composite). Se calculó también el área bajo la curva de insulina basal, estimulada e incremental y la constante de utilización de la glucosa. El ISI-C fue menor en las borregas con restricción alimenticia ( $636,43 \pm 125,66$ ) en comparación con las borregas controles ( $1528,18 \pm 297,61$   $P < 0,05$ ). En concordancia con estos resultados, el área bajo la curva incremental fue menor en las borregas controles ( $290,54 \pm 79,45$  ng/ml/30 min) que en las con restricción alimenticia ( $642,16 \pm 140,04$  ng/mL/30 min,  $P < 0,05$ ). La constante de utilización de la glucosa fue similar en ambos grupos. Los resultados sugieren que la restricción alimenticia conduce a una resistencia insulínica como un proceso adaptativo a la escasa provisión de alimento en la oveja en crecimiento.

## AGRADECIMIENTOS

A los alumnos de medicina veterinaria: Francisca Arrate y Juan Pablo Muñoz por su ayuda con los experimentos. Al Dr. Mario Briones por su asesoría estadística.

## REFERENCIAS

- Boden G. 1996. Fatty acids and insulin resistance. *Diabetes Care* 19, 394-395.
- Boden G. 2003. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: Significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111, 121-125.
- Brüning JC, D Gautam, DJ Burks, J Gillette, M Schubert, PC Orban, R Klein, W Krone, D Muller-Wieland, CR Khan. 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-2125.
- Foster DL, S Nagatani. 1999. Physiological perspectives of leptin as a regulator of reproduction. Role in timing puberty. *Biol Reprod* 60, 205-215.
- Hauer H, T Petruschke, M Russ, K Rohrig, J Eckel. 1995. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cell in cell culture. *Diabetología* 38, 764-771.
- Havrankova J, M Brownstein, J Roth. 1981. Insulin and insulin receptors in rodent brain. *Diabetología* 20 Suppl, 268-273.

- Hopkins DF, G Williams. 1997. Insulin receptors are widely distributed in human brain and bind human and porcine insulin with equal affinity. *Diabet Med* 14, 1044-1050.
- Hotamisligil GS, A Budavari, DL Murray, BM Spiegelman. 1994. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes: central role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Clin Invest* 94, 1543-1549.
- Kahn CR 1997. Insulin receptors and insulin signaling in normal and disease states. En: *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Ed. K.G.M.M. Alberti, P. Zimmet, RA DeFronzo, H. Keen. Second Edition pp 437-467, John Wiley and Sons Ltd.
- Kyriaki G 2003. Brain insulin: Regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol* 23, 1-25.
- Kern PA, M Saghizadeh, JM Ong, RJ Bosch, R deem, RB Simsolo. 1995. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation of obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95, 2111-2119.
- Landau BR, Y Takaoka, MA Abrams, SM Genuth, M Van Houten, BI Posner, RJ White, S Ohgaku, A Horvat, E Hemmelgarn. 1983. Binding of insulin by monkey and pig hypothalamus. *Diabetes* 32, 284-291.
- Lebovitz HE 2001. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Suppl* 2, S135-S148.
- Matsuda M, RA DeFronzo. 1999. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22, 1462-1470.
- Memon RA, KR Feingold, AH Moser, J Fuller, C Grunfeld. 1998. Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines. *Am J Physiol* 274, E210-E217.
- Miller DW, D Blache, R Boukhliq, JD Curlewis, GB Martin. 1998. Central metabolic messengers and the effects of nutrition on gonadotrophin secretion in sheep. *J Reprod Fert* 112: 347-356.
- Olson BR, DC Scott, WC Wetsel, SJ Elliot, M Tomic, S Stojilkovic, LK Nieman, S Wray. 1995. Effects of insulin-like growth factors I and II and insulin on the immortalized hypothalamic GTI-7 cell line. *Neuroendocrinology* 62, 155-165.
- Petterson JA, FR Dunshea, RA Ehrhardt, AW Bell. 1993. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *J Nutr* 123, 1286-1295.
- Porte D Jr, DG Baskin, MW Schwartz. 2002. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* 60, 20-29.
- Ravussin, E 2002. Adiponectin enhances insulin action by decreasing ectopic fat deposition. *Pharmacogenomics J* 2, 4-7.
- Recabarren SE, A Urrucelqui, M Robbiano, A Lobos, P Orellana, J Parilo. 1995. Efecto de la infusión endovenosa de L-arginina y L-ornitina sobre la secreción de hormona del crecimiento en ovejas prepúberes. *Arch Med Vet* 27, 99-104.
- Recabarren SE 1999. Stress nutricional y regulación neuroendocrina hipotalámica. *Agro-Ciencia* 15, 215-220.
- Recabarren SE, A Lobos, C Schneider, R Núñez, J Cox, J Parilo. 2000. Sensibilidad tisular a la insulina antes, durante y después de un ayuno en ovejas prepúberes. *Arch Med Vet* 32, 139-146.
- Recabarren SE, A Lobos, V Torres, R Oyarzo, T Sir-Petermann. 2004. Secretory patterns of leptin and luteinizing hormone in food-restricted young female sheep. *Biol Res* 37, 371-384.
- Sahu, A, MG Dube, CP Phelps, CA Sninsky, PS Kalra, SP Kalra. 1995. Insulin and insulin-like growth factor II suppress neuropeptide Y release from the nerve terminals in the paraventricular nucleus: a putative hypothalamic site for energy homeostasis. *Endocrinology* 136, 5718-5724.
- Schluter KJ, J Andre, F Enzmann, L Kerp. 1984. Insulin receptor binding in pork brain: different affinities of porcine and human insulin. *Horm Metab Res* 16, 411-414.
- Schwartz MW, DP Figlewicz, DG Baskin, SC Woods, D Porte Jr. 1992. Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13, 387-414.
- Steiner RA, JL Cameron, TH McNeill, DF Clifton, WJ Bremner. 1983. Metabolic signals for the onset of puberty. En: *Neuroendocrine aspects of reproduction*. Ed: RL Norman, pp 183-228, Academic Press NY.
- Tanaka T, S Nagatani, DC Bucholtz, S Ohkura, H Tsukamura, K-I Maeda, DL Foster. 2000. Central actions of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biol Reprod* 62, 1256-1261.
- Van Houten M, BI Posner, BM Kopriva, JR Brawer. 1980. Insulin binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate nucleus. *Science* 207, 1081-1083.
- Vernon RG, A Faulkner, WW Hay Jr, DT Calvert, DJ Flint. 1990. Insulin resistance of hind-limb tissues *in vivo* in lactating sheep. *Biochem J* 270, 783-786.