

Izabela Martina Ramos Ribeiro

**Ação central da insulina e do sistema
nervoso autônomo sobre a Produção
Hepática de Glicose de ratos não
anestesiados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Versão Original

São Paulo

RESUMO

RIBEIRO, I.M.R. **Ação central da insulina e do sistema nervoso autônomo sobre a produção hepática de glicose de ratos não anestesiados.** 2012, 80f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A glicose é considerada o combustível mais importante para a manutenção das atividades de diversos tecidos corporais. O fígado é um órgão chave na manutenção da homeostase da glicose e para que isto ocorra é necessária a presença de hormônios, tais como a insulina que pode desempenhar sua função agindo tanto em nível periférico como centralmente. Além disso, estudos demonstram que o sistema nervoso autônomo (SNA) desempenha uma função extremamente importante no controle da glicemia. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da insulina injetada no sistema nervoso central sobre a produção hepática de glicose (PHG), além de verificar o papel do SNA na modulação dessa variável em ratos livres de anestesia. Para isto, utilizamos um modelo animal de hiperatividade simpática, (SHR) e seu controle (Wistar). Antecedendo todos os experimentos, os animais foram mantidos em privação alimentar por um período de 12 h. A insulina e/ou insulina denaturada (controle-veículo) foi injetada no ventrículo lateral (VL) cerebral ($100\eta\text{U}/\mu\text{l}$) e a PHG, PAM e FC foram monitorados aos 2, 5, 10, 20 e 30 min. subsequentes. No grupo Wistar observamos uma queda máxima na PHG aos 10 min. após a microinjeção de insulina no VL ($81 \pm 8\text{mg/dL}$) quando comparados ao seu valor basal antes da insulina ($110\text{mg/dL} \pm 5$) e ao grupo controle (insulina denaturada) no mesmo decurso temporal ($118 \pm 3\text{mg/dL}$). Em outro grupo experimental verificamos que o antagonismo periférico dos receptores muscarínicos (metil-atropina, 2mg/Kg , *i.v.*) foi capaz de bloquear a queda na PHG decorrente da ação central da insulina no mesmo decurso temporal (10 min: $92 \pm 2\text{mg/dL}$ vs basal: $88 \pm 2\text{mg/dL}$). Por outro lado, o antagonismo periférico dos receptores adrenérgicos (fentolamina, 3mg/Kg e propranolol, $0,5\text{mg/Kg}$, *i.v.*, respectivamente) não afetou a queda da PHG após administração da insulina no VL. No grupo SHR a insulina injetada no VL não promoveu alterações na PHG nos tempos avaliados. A PAM e FC não sofreram qualquer alteração após a injeção central de insulina em ambas as linhagens de animais. Para avaliar a função do SNA sobre a PHG basal independente da ação central da insulina de ambas as linhagens realizamos o antagonismo periférico dos receptores adrenérgicos e muscarínicos e a PHG foi monitorada aos 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min. subsequentes. Os resultados mostraram que o bloqueio adrenérgico diminuiu a PHG com maior queda aos 40 min. tanto nos animais Wistar ($79 \pm 2\text{mg/dL}$; -25%) quanto nos SHR ($93 \pm 8\text{mg/dL}$; -22%) em relação ao basal (Wistar: $106 \pm 2\text{mg/dL}$ e SHR: $118 \pm 8\text{mg/dL}$). O bloqueio periférico dos receptores muscarínicos não alterou a PHG em ambas as linhagens. O conjunto dos resultados obtidos nos leva a concluir que, durante uma situação de jejum prolongado, a alça parassimpática do SNA é a principal responsável pela rápida queda na PHG causada pela ação central da insulina em animais Wistar, porém não em SHR. Por outro lado, o sistema autônomo simpático desempenha maior influência tônica no controle da PHG basal do que a alça parassimpática, independente da ação central da insulina tanto em SHR quanto em Wistar.

Palavras-chave: Insulina, Glicemia, Sistema Nervoso Autônomo, SHR.

ABSTRACT

RIBEIRO, I,M,R. **Central action of insulin and the sympathetic nervous system on hepatic glucose production of conscious rats.** 2012, 80p. Master thesis (Human physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Glucose is considered the most important fuel for the maintenance of cell's activity. The liver is a key organ in maintaining glucose homeostasis and it requires the presence of hormones such as insulin that can perform its function by acting at both peripheral and central level. In addition, several studies have shown that the autonomic nervous system (ANS) plays an essential role in the control of blood sugar level. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of insulin injected into the central nervous system on hepatic glucose production (HGP), and to verify the role of ANS in the modulation of this variable in conscious rats. For this, we have used an animal model of sympathetic overactivity (SHR) and its control (Wistar). Animals were kept in food deprivation for a period of 12h. Insulin and/or denatured insulin (vehicle control) was injected into the lateral ventricle (LV) of the brain (100nU/ μ l) and HGP, MAP and HR were monitored at 2, 5, 10, 20 and 30 min later. In the Wistar group we were able to observe a maximal fall in PHG at 10 min after microinjection of insulin in the VL (81 ± 8 mg/dL) compared to the baseline (110 ± 5 mg/dL) and to the control group (denatured insulin) in the same time course (118 ± 3 mg/dL). In a different Wistar group we have found that the pretreatment of rats with peripheral antagonist of muscarinic receptors (methyl-atropine 2 mg/kg, *iv*) completely abolished the fall in HGP induced by central microinjection of insulin at the same time course (10 min: 92 ± 2 mg/dL vs basal 88 ± 2 mg/dL). As opposed to the above prototypes of muscarinic inhibitors, the antagonism of peripheral adrenergic receptors (phentolamine, 3mg/kg and propranolol, 0.5 mg / kg, *iv*) did not affect the decrease of HGP elicited by microinjection of insulin in the VL. In the SHR group the central insulin injection failed to produce changes in HGP at any time evaluated. The MAP and HR were not affected by central injection of insulin in both strains of animals. In order to evaluate the role of ANS on the basal HGP, independent of central action of insulin, we performed, in both strains, the peripheral antagonism of adrenergic and muscarinic receptors by monitoring the HGP at 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min later. The results have shown that the adrenergic receptors blockade, *per se*, caused a fall in the HGP with a greater decreasing at 40 min, as in Wistar (79 ± 2 mg/dL, -25%) as well as in SHR (93 ± 8 mg/dL, -22%) when compared to the baseline values (Wistar: 106 ± 2 mg/dL and SHR: 118 ± 8 mg/dL). On the other hand, the blockade of peripheral muscarinic receptors did not alter the HGP in both strains. Taken together, our results allow us to conclude that during starvation, the parasympathetic outflow seems to be predominant to produce the decrease in the HGP caused by central action of insulin in Wistar, but not in SHR. On the other hand, the autonomic sympathetic system plays a greater influence on the tonic baseline control of HGP than the parasympathetic, independent of the central action of insulin, in both SHR and Wistar.

Key-words: Insulin, Glucose, Sympathetic Nervous System, SHR.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A glicose é considerada o substrato energético mais importante para a manutenção das atividades de diversos tecidos corporais. O cérebro, por exemplo, consome cerca de 60% da glicose sanguínea em um indivíduo em repouso. Tanto a indisponibilidade quanto o aumento indiscriminado na concentração de glicose no sangue são capazes de provocar disfunção de diversas células e sistemas corporais. Tamanha é a importância da glicose para a manutenção da atividade neuronal e de diversos outros tecidos que seus níveis plasmáticos são finamente controlados por inúmeros mecanismos capazes de impedir grandes variações desta molécula que é essencial à vida.

A concentração plasmática de glicose (glicemia) é resultado do equilíbrio entre entrada e saída da glicose circulação. Os principais processos metabólicos responsáveis pela entrada de glicose na circulação são: i) absorção intestinal de carboidratos durante o período alimentar, ii) hidrólise dos estoques endógenos de glicogênio tecidual (glicogenólise) e iii) síntese de glicose a partir de substratos de 3 carbonos como aminoácidos, lactato e glicerol pelo fígado, rins e intestino (gliconeogênese). O fígado é um órgão fundamental na manutenção da glicemia devido a sua capacidade de estocar grandes quantidades de glicose na forma de glicogênio quando os níveis circulantes desta substância estão altos. Além disso, o fígado também é capaz de promover a quebra do glicogênio e liberar glicose para a circulação quando seus níveis estão baixos mantendo, portanto, um equilíbrio entre a liberação e a captação de glicose plasmática. Para que todo este processo ocorra é fundamental a presença de dois hormônios principais: a insulina e o glucagon. Em uma situação pós-prandial, por exemplo, os níveis circulantes de glicose desencadeiam um aumento na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. A insulina estimula a captação de glicose pelos tecidos muscular esquelético e adiposo, além de suprimir a produção e liberação de glicose pelo fígado (ARONOFF et al., 2004; WASSERMAN, 2009).

A insulina é, portanto, um potente hormônio anabólico capaz de controlar, além de outras funções, a captação e utilização de glicose pelos tecidos. Outro hormônio também produzido e liberado pelo pâncreas (células alfa) é o glucagon que, ao

contrário do que acontece com a insulina, está aumentado em situações de jejum onde os níveis glicêmicos tendem a diminuir. Para manter a glicemia em níveis adequados este hormônio estimula a glicogenólise e gliconeogênese e, conseqüentemente, a liberação de glicose pelo fígado. O retorno da glicemia aos níveis basais inibe a secreção de glucagon. Outras substâncias, tais como, a noradrenalina liberada pelas terminações simpáticas pós-ganglionares, a adrenalina liberada pela glândula suprarrenal, os glicocorticóides, as incretinas e amilinas são capazes de interferir na função hepática a fim de aumentar ou diminuir a liberação e/ou captação de glicose por este tecido (ARONOFF et al., 2004).

A glicemia é, portanto, uma variável controlada por uma infinidade de mecanismos face ao seu essencial papel sobre as funções orgânicas. E como este controle está intimamente relacionado à ação da insulina e ao funcionamento hepático, é importante compreender o elo entre a ação deste hormônio e o controle da glicemia via produção hepática de glicose (PHG), principalmente pela sua ação em territórios extra-hepáticos. Neste sentido, uma das hipóteses deste nosso estudo é que a PHG seria finamente controlada pela ação da insulina ao nível do sistema nervoso central, principalmente por modular o sistema nervoso autônomo.

1.1 Ações moleculares da insulina

A capacidade do organismo humano em poupar reservas energéticas nas situações de abundante oferta de alimento, com a finalidade de gerar estoques que possam prover o funcionamento de órgãos vitais durante períodos de escassez nutricional, é uma das mais complexas e fascinantes facetas metabólicas de nossa espécie. A insulina, hormônio produzido e secretado pelas células beta pancreáticas em resposta a um aumento na concentração plasmática de glicose e aminoácidos é um dos principais hormônios envolvidos nesta plasticidade metabólica (CAVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD; 2002; ARONOFF et al. 2004).

A insulina é um hormônio anabólico indispensável para a homeostase da glicemia, além de desempenhar outras funções como crescimento e diferenciação celular. A pré-pró-insulina (sintetizada pelo poliribossomo) é o precursor da insulina e é um peptídeo sinalizador que tem como finalidade direcionar a cadeia peptídica para o

retículo endoplasmático onde a pró-insulina é produzida pela clivagem do peptídeo sinalizador e formação de pontes de dissulfeto (MENEGON; 1997). A pró-insulina contém a sequência de aminoácidos da insulina, mais uma sequência de 31 aminoácidos, o peptídeo C (conector), e é armazenada em grânulos secretórios associados à membrana quando entra no complexo de Golgi. Nestes grânulos estão armazenadas também as proteases que clivam a pró-insulina. O hormônio maduro consiste em duas cadeias, uma cadeia alfa e uma beta, ambas conectadas por duas pontes dissulfeto (WHITE, 2009).

A insulina regula a homeostase glicêmica de diversas maneiras, seja reduzindo a PHG ou aumentando a captação periférica de glicose em tecidos que possa estocá-la e consumi-la, tais como, o tecido muscular e adiposo. Além disso, a insulina estimula a conversão de glicose em ácidos graxos e glicerol 3-fosfato e a síntese de triacilglicerol (lipogênese) no fígado e nos adipócitos, onde a insulina inibe a lipólise. No músculo esquelético e cardíaco a insulina aumenta a síntese e inibe a degradação de proteínas (CAVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; KAHN, 1996). Atuando na gliconeogênese a insulina inibe a transcrição de genes que codificam a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), além de diminuir a taxa de transcrição do gene que codifica a enzima frutose-1,6- bifosfatase e a glicose 6 fosfatase e aumentar a transcrição gênica de enzimas glicolíticas como glicoquinase e piruvato quinase (PILKIS; GRANNER, 1992; SUTHERLAND; O'BRIEN; GRANNER, 1996; CAVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002;). Além disso, a insulina também é capaz de alterar a quantidade de ácidos graxos livres liberados na gordura visceral (BERGMAN, 1997).

Para desempenhar estas funções, a insulina age ligando-se a um receptor específico de membrana. Este receptor é uma proteína heterotetramérica com atividade quinase composta por 4 subunidades, duas alfa com domínio extracelular que contém o sítio de ligação da insulina e duas beta com domínio intracelular e atividade tirosina quinase. Na ausência de insulina a subunidade alfa age como um inibidor alostérico da subunidade beta inibindo a atividade tirosina quinase da mesma. A ligação da insulina com o receptor promove uma alteração conformacional na subunidade alfa aumentando a atividade tirosina quinase da subunidade beta que se auto fosforila, bem como, fosforila inúmeros substratos em tirosina (WHITE, 1997; PESSIN; SALTIEL, 2000; CAVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002), incluindo o substrato do receptor da insulina (*insulin receptor substrate*, IRS) 1, 2, 3 e 4, a isoforma Shc, membros da família SIRP,

Gab-1, Cbl e APS. A fosforilação das proteínas IRS criam sítios de reconhecimento para moléculas efetoras adicionais contendo domínios de homologia a Src 2 (SH2), esses incluem Grb2 e Nck, proteína tirosina fosfatase SHP2 e a mais importante, a subunidade regulatória do tipo 1, fosfatidilinositol 3-quinase, PI3-K (FOLLI et al., 1992; PESSIN; SALTIEL, 2000). A PI3-K é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulada pela insulina. As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a PKB e as isoformas atípicas da PKC (FOLLI et al., 1992). A insulina também é capaz de estimular a proteína quinase ativada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK). Essa via inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc que interagem com a proteína Grb2 e que está constitutivamente associada à SOS, uma proteína que troca o GDP por GTP da RAS ativando-a. Uma vez ativada, a RAS estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celulares (BOULTON et al., 1991; PAEZ-SPINOZA, 1999; VIRKAMÄKI; UEKI; KAHN, 1999; CAVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). O músculo esquelético é o primeiro tecido responsável pela captação de glicose dependente de insulina possuindo um importante papel na manutenção da homeostase da glicemia. Esta captação de glicose ocorre através de um sistema de difusão facilitada envolvendo um transportador denominado GLUT-4 (KLIP; PANKET, 1990).

1.2 Ação da insulina no sistema nervoso central

Apesar de ser relativamente bem esclarecida a relevância metabólica da modulação direta da gliconeogênese e glicogenólise pela insulina, ainda necessita-se compreender melhor a regulação indireta da PHG mediada pela ação da insulina em territórios extra-hepáticos. Por muitos anos, considerava-se que a insulina seria incapaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) e ter impacto em funções cerebrais e sistêmicas. Há algumas décadas estes conceitos foram quebrados quando estudos demonstraram a existência de uma grande densidade de receptores de insulina no hipotálamo e bulbo olfatório de ratos (BASKIN et al., 1983; WERTHER et al., 1987). Há evidências na literatura de que o cérebro é um órgão sensível à insulina sendo esta captada do plasma e levada ao sistema nervoso central (SNC) atravessando a BHE (BASKIN et al., 1987; DAVIS et al., 1995). Ainda neste sentido, alguns estudos

mostraram que além de atravessar a BHE através de um transporte saturável (BAURA et al., 1993), a insulina desempenha inúmeras funções de fundamental importância no controle da homeostase, dentre elas, o comportamento alimentar, memória, crescimento e maturação neuronal, reflexos cardiovasculares e reprodução (YANG; RAIZADA; FELLOWS, 1981; BASKIN et al., 1983; MCKERNAN; CALARESU, 1996; ZHAO et al., 1999; GEROZISSIS, 2002; PICHER; FREEMAN; BROOKS, 2008).

Ao que se refere ao controle da homeostase glicêmica estudos demonstraram que a injeção de insulina na artéria carótida de ratos anestesiados promoveu queda imediata na glicemia (SZABO; SZABO, 1975). Mais tarde, outro trabalho na literatura relatou a mesma queda na glicemia após microinjeção de insulina diretamente no hipotálamo ventromedial (VMH) em ratos anestesiados (SZABO et al., 1983). Estudos de Obici et al (2002), evidenciaram que a insulina agindo especificamente no hipotálamo (microinjeção no terceiro ventrículo) promoveu queda na PHG, resultados estes corroborados com Poci et al (2005) que defenderam a teoria de que a gliconeogênese hepática seria afetada negativamente pela ação central da insulina em núcleos hipotalâmicos específicos. É sabido que o hipotálamo possui um papel crucial na regulação da homeostase da glicose, incluindo glicogenólise, gliconeogênese e função pancreática. No entanto, como ocorre a transmissão da informação a partir do sistema nervoso central até o fígado é foco atual de investigações por parte de vários grupos. Neste sentido, supomos que o sistema nervoso autônomo (SNA) desempenharia um papel crucial nesta sinalização entre a ação central da insulina e o controle da PHG em animais livres de anestesia.

1.3 Ação da insulina sobre o SNA

Evidências acumuladas nos últimos 60 anos demonstram que, além da inibição direta da PHG pela insulina, este fenômeno é também estimulado por hormônios conhecidos como “contra-reguladores”, cujas concentrações, ao contrário da insulina, estão aumentadas durante o jejum (i.e.: catecolaminas e glicocorticóides). As catecolaminas, de maneira geral, aumentam a PHG por estimular tanto a glicogenólise quanto a gliconeogênese. O estímulo da gliconeogênese é alcançado de maneira eficiente tanto pelo aumento de catecolaminas circulantes secretadas pela medula da

adrenal quanto pela liberação pós-ganglionar de catecolaminas pelas fibras simpáticas que inervam o fígado (NONOGAKI, 2000). Outro estudo, demonstrou alterações da atividade simpática, de maneira não uniforme para músculos e tecido cutâneo com a técnica de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em seres humanos, concluindo que a insulina seria capaz de alterar a atividade simpática para territórios específicos (BERNE et al., 1992). Seguindo esta mesma linha, autores como Morgan et al (1993) demonstraram em um estudo também utilizando *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos anestesiados que a insulina promoveu um aumento na frequência de disparos de potenciais de ação do nervo simpático adrenal e lombar (com maior magnitude de aumento no território adrenal em animais hipertensos) e nenhuma alteração para o território renal. Apesar destes estudos terem sido realizados por meio de uma técnica que promove aumento sistêmico nos níveis de insulina, outros autores verificaram que injeção de insulina no terceiro ventrículo também produzira respostas semelhantes, ou seja, modulando a atividade simpática de maneira não uniforme para regiões distintas sem alterar pressão arterial ou frequência cardíaca (MUNTZEL et al., 1994; MUNTZEL et al., 1995).

Apesar de inúmeros estudos evidenciarem a ação da insulina na modulação da atividade simpática, há na literatura, dados que defendem a teoria de que a PHG é afetada negativamente pela ação da insulina por ativação do sistema nervoso autônomo parassimpático, via ramo hepático do nervo vago. Esta última afirmação é corroborada por trabalhos que demonstraram que tanto a vagotomia quanto o tratamento prévio com atropina (antagonista muscarínico) impedem a supressão da PHG induzida pela injeção central de insulina no hipotálamo ventromedial de animais anestesiados (SZABO et al., 1983; POCAI et al., 2005).

Parece haver uma divisão de grupos neuronais hipotalâmicos que modulam de forma diferenciada cada uma das alças de controle da PHG, sendo que os neurônios no hipotálamo ventromedial estimulariam a glicogenólise por meio da ativação da alça simpática do SNA, enquanto neurônios localizados no hipotálamo lateral estimulariam a gliconeogênese via ativação do sistema parassimpático (MITHIEUX, 2010). Alguns estudos, no entanto, demonstram que a simples ativação dos ramos simpáticos ou vagais para o território hepático modula PHG independentemente da ação da insulina. Um exemplo disto foram os trabalhos que demonstraram que a estimulação elétrica do nervo esplâncnico promove a depleção do glicogênio hepático e aumento da glicemia

em animais adrenalectomizados, atribuindo esta resposta essencialmente à ativação do nervo simpático para o fígado (EDWARDS; SILVER, 1970). Além disso, outros estudos encontraram uma ativação de enzimas glicogenolíticas em resposta à estimulação do ramo simpático esplâncnico, concluindo que a inervação simpática controla a glicogenólise hepática (SHIMAZU; AMAKAWA, 1968).

Apesar de haver algumas evidências relacionadas ao controle da PHG via SNA, pouco ainda se sabe de como ocorre o equilíbrio simpato-vagal na modulação da ação inter-órgãos (eixo cérebro-fígado) da insulina na PHG e, além disso, como estaria esta sinalização em uma situação de hiperatividade simpática, como é o caso do modelo experimental de animal espontaneamente hipertenso (SHR).

8 CONCLUSÃO

Com base em nossos achados podemos concluir que a insulina, agindo no SNC, controla de maneira rápida a PHG em Wistar, porém não em SHR, e esse controle depende da alça parassimpática do SNA. Além disso, o fato da insulina central não afetar a glicemia de jejum em SHR pode estar relacionado à resistência central à insulina, ou à hipertonia simpática ou mesmo da combinação destes dois fatores nesta linhagem. Além disso, podemos também concluir que o equilíbrio simpato-vagal é fundamental para controlar e manter a glicemia de jejum, independente da ação central da insulina, tanto em Wistar como em SHR, porém aparentemente a influência da alça simpática para o fígado seja mais importante nesta situação.

REFERÊNCIAS

ALGELIS, K.; SCHAAN, B. A.; RODRIGUES, B.; MALFITANO, C.; IRIGOYEN, M C. Disfunção autonômica cardiovascular no diabetes mellitus experimental. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, p. 85-194, 2007.

ARONOFF, S L.; BERKOWITZ, K.; SHREINER, R N.; WANT, L. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. **Diabetes Spectrum.**, v. 17, p.183-190, 2004.

BANKS, W A.; FAAR, S A.; MORLEY, J E. Permeability of the blood-brain barrier to albumin and insulin in the young and aged SAMP8 Mouse. **J. Geronto.**, v. 55, p. 601-606, 2000.

BASKIN, D G.; FIGLEWICZ, D P.; WOODS, S C.; PORTE, D; DORSA, D M. Insulin in the brain. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 49, p. 335-347, 1987.

BASKIN, D G.; PORTE, D J R.; GUEST, K; DORSA, D M. Regional concentrations of insulin in the rat brain. **Endocrinology.**, v. 112, p. 898-903, 1983.

BAURA, G D.; FOSTER, D M.; PORTE D Jr., KAHN, S E.; BERGMAN, R N.; COBELLI, C; SCHWARTZ, M W. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 1824-1830, 1993.

BERGMAN, R N. New concepts in extracellular signaling for insulin action: the single gateway hypothesis. **Recent. Progr. Horm. Res.**, v. 52, p. 359-385, 1997.

BERNE, C.; FAGIUS, J.; POLLARE, T.; HJEMDAHL, P. The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from microelectrode nerve recordings in healthy subjects. **Diabetologia.**, v. 35, p. 873-879, 1992.

BOULTON, T G.; NYE, SH; ROBBINS, DJ; IP, NY; RADZIEJEWSKA, E; MORGENBESSER, S D.; DEPINHO, R A.; PANAYOTATOS, N; COBB, M H.; YANCOPOULOS, G D. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. **Cell.**, v. 65, p. 663-675, 1991.

BOYLE, P J.; LIGGETT, S B.; SHAH, S D.; CRYER, P E. Direct muscarinic cholinergic inhibition of hepatic glucose production in humans. **J. Clin. Invest.**, v. 82, p. 445-449, 1988.

CABASSI, A.; CALZOLARI, M.; BRUSCHI, G.; BORGHETTI, A. Regional sympathetic activity in pré-hypertensive phase of spontaneously hypertensive phase of spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, v. 62, p. 111-118, 1998.

CASSAGLIA, P A.; HERMES, S M.; AICHER, S A.; BRROKS, V L. Insulin acts in the arcuate nucleus to increase lumbar sympathetic nerve activity and baroreflex function in rats. **J. Physiol.**, v. 589, p. 1643-1662, 2011.

CARVALHEIRA, J B C.; ZECCHIN, H G.; SAAD, M J A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, p. 419-425, 2002.

DAVIS, S N.; COLBURN, C.; DOBBINS, R.; NADEAU, S.; NEAL, D.; WILLIAMS, P.; CHERRINGTON, A D. Evidence that the brain of the counscious dog is insulin sensitive. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 593-602, 1995.

DICKHOUT, J G.; LEE, R M K W. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **AM. J. Physiol. Heart.**, v. 274, p. H794-H800, 1998.

EDWARDS, A V; SILVER, M. The glycogenolytic response to stimulation of the splanchnic nerve in adrenalectomized calves. **J. physiol.**, v. 211, p. 109-124, 1970.

FUKUDA, S; TSUCHIKURA, S; IIDA, H. Age-related changes in blood pressure, hematological values, Concentrations of Serum Biochemical Constituents and Weights of Organs in the SHR/lzm, SHRSP/lzm and WKY/lzm. **Exp. Anim.**, v. 53, p. 67-72, 2004.

FERRANNINI, E.; BUZZIGOLI, G.; BONADONNA, R.; GIORICO, M A.; OLEGGINI, M.; GRAZIADEI, L.; PEDRINELLI, R.; BRANDI, L.; BEVILACQUA, S. Insulin resistance in essential hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 350-357, 1987.

FOLLI, F S.; SAAD, M J A.; BACKER, J.; KAHN, R. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-Kinase activity and association with insulin receptor substrate1 in liver and muscleof the intact rat. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22171-22177, 1992.

GARCEAU D.; YAMAGUCHI N.; GOYER R.; GUITARD F. Correlation between endogenous noradrenaline and glucose released from the liver upon hepatic sympathetic nerve stimulation in anesthetized dogs. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 62, p. 1086-1091, 1984.

GEROZISSIS, K. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v.23, p. 1-25, 2003.

GOUVEIA L M F B.; KETTELHUT I C.; FOSS M C. Abnormalities of glucose metabolism in spontaneously hypertensive rats. **Braz. J. Med. and Bio. Res.**, v. 33, p. 1357-1362, 2000.

HAVRANKOVA, J.; BROWNSTEIN, M.; ROTH, J. Insulin and insulin receptors in rodent brain. **Diabetologia**, v. 20, p. 268-273, 1981.

HULMAN, S.; FALKNER, B.; FREYVOGEL, N. Insulin resistance in the conscious spontaneously hypertensive rat: euglycemic hyperinsulinemic clamp study. **Metabolism**, v. 42, p. 14-18, 1993.

IGUCHI, A.; BURLESON, P D.; SZABO, A J. Decrease in plasma glucose concentration after microinjection of insulin into VMN. **Am. J. Physiol. Metab.**, v. 240, p. 95-100, 1981.

KAHN, BB. ; Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. **Diabetes**, v. 45, p. 1644-1654, 1996.

KLIP A.; PÂQUET, M R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. **Diab. Care.**, v. 13, p. 228-243, 1990.

KNOBLER H.; ABBASI F.; LAMENDOLA C.; REAVEN G M. Insulin resistance and cardiovascular disease risk factors in subjects with prehypertension. **Diab. Vasc. Dis Res.**, v. 8, p. 43-46, 2011.

LAUTT, W W.; WONG, C. Hepatic glucose balance in response to direct stimulation of sympathetic nerves in the intact liver of cats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 56, p. 1022-1028, 1978.

LEAHY, J L.; CHEN, C.; RHODES, C. How is the insulin content regulated in nondiabetic hyperinsulinaemic, insulin resistant states? Study of spontaneously hypertensive rats. **Diabetologia**, v. 41, p. 855-859, 1998.

LIU, J; DILVA, A A.; TALLAM, L S.; HALL, J E. Chronic central nervous system hyperinsulinemia and regulation of arterial pressure and food intake. **J. Hypertens.**, v. 24, p. 1391-1395, 2006.

MAYER, M A.; GIANI, J F.; HOCHT, C.; SILBERMAN, E A.; MUÑOZ, M C. ; TAIRA, C A.; DOMINICI, F P.; PUYÓ, A M.; FERNANDEZ, B E. Centrally administered insulin potentiates the pressor response to angiotensin II. **Regul. Pept.**, v. 163, p. 57-61, 2010.

MCKERNAN, A M.; CALARESU, F R. Insulin microinjection into the nucleus tractus solitarii of the rat attenuates the baroreceptor reflex. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 61, p. 128-138, 1996.

MENEGON, L F. *Efeitos da administração intracerebroventricular sobre a excreção urinária de sódio e vias de sinalização da insulina em hipotálamo de ratos hipertensos.* 89 f. Tese (Doutorado em fisiopatologia médica). Faculdade de

Ciências médicas. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 2007.

MITHIEUX, G. Brain, liver, intestine: a triumvirate to coordinate insulin sensitivity of endogenous glucose production. **Diab. Metab.**, v. 36, p. 50-53, 2010.

MORGAN, D A.; BALON, T W.; GINSBERG, B H., MARK, A L. Nonuniform regional sympathetic nerve responses to hyperinsulinemia in rats. **AM. J. Physiol.**, v. 264, p. 423-427, 1993.

MUNTZEL, M A.; ANDERSON, E A.; JOHNSON, A K.; MARK, A L. Mechanisms of insulin action on sympathetic nerve activity. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 17, p. 39-50, 1995.

MUNTZEL, M S.; MORGAN, D A.; MARK, A L.; JOHNSON, A K. Intracerebroventricular insulin produces nonuniform regional increases in sympathetic nerve activity. **Am. J. Physiol.**, v. 267, 1994.

NAGAI, R.; NAGATA, S.; FUKUIA, F.; HIGAKI, J.; RACUJI, H.; OJIHARA, T. Changes in autonomic activity and baroreflex sensitivity with the hypertension process and age in rats. **Clin. Exp. Pharm. Phys.**, v. 30, p. 419-425, 2003.

NATALUCCI, S.; RUGGERI, P.; COGO, C E.; PICCHIO, V.; BURATTINII, R. Insulin sensitivity and glucose effectiveness estimated by the minimal model technique in spontaneously hypertensive and normal rats. **Exp. phys.**, v. 85, p. 775-781, 2010.

NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. **Diabetologia**, v. 43, p. 533-549, 2000.

OBICI, S.; ZHANG, B B.; KARKANIAS, G.; ROSSETI, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. **Nat. Med.** v. 8, p. 1376-1382, 2002.

PÁEZ- ESPINOZA, E V.; ROCHA, E M.; VELLOSO, L A.; BOSCHERO, AC; SAAD, MJ. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 156, p. 121-129, 1999.

PAXINOS G.; WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York, Academic Press, 1986. 237p.

PESSIN, J E.; SALTIEL, A R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 165-169, 2000.

PICHER, M P.; FREEMAN, K L.; BROOKS, V L. Insulin in the brain increases gain of baroreflex control of heart rate and lumbar sympathetic nerve activity. **Hypertension**, v. 51, p. 514-520, 2008.

PILKIS, S J.; GRANNER, D K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 54, p. 885-909, 1992.

PLUM, L.; SCHUBERT, M.; BRÜNING, J. The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends Endocrinol. Metabol.**, v. 16, p. 59-65, 2005.

POCAI, A.; LAM, T K.; GUTIERREZ-JUAREZ, R.; OBICI, S.; SCHWARTZ, G J.; BRYAN, J.; AGUILAR-BRYAN, L.; ROSSETTI, L. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. **Nature**, v. 434, p. 1026- 1031, 2005.

POLLARE, T.; LITHELL, H.; BERNE, C. Insulin resistance is a characteristic feature of primary hypertension independent of obesity. **Metabolism.**, v. 39, p. 167-174, 1990.

POTENZA, M A.; MARASCIULO, F L.; TARQUININO, M.; QUON, M J.; MONTAGNANI, M. Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone and/or enalapril restores balance between vasodilator and vasoconstrictor actions of insulin with simultaneous improvement in hypertension and insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 297, p. 685-694, 2009.

RIBEIRO, R T.; AFONSO, R A.; MACEDO, M P. Hepatic parasympathetic role in insulin resistance on an animal model of hypertension. **Metabol. Clin. Exp.**, v. 56, p. 227- 233, 2007.

SECCHI, L A.; GRIFFIN, C A.; GIACCHETTI, G.; ZINGARO, L.; CATENA, C.; BARTOLI, E.; SCHAMBELAN, E. Abnormalities of insulin receptors in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 27, p. 955-961, 1996.

SHIMAMOTO, K.; URA, N. Mechanisms of insulin resistance in hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypert.**, v. 28, p. 543-552, 2006.

SHIMAZU, T.; AMAKAWA, A. Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system II. Neural control of glycogenolytic enzymes. **Bioch. Biophys. Acta.**, v. 165, p. 335-348, 1968.

SUTHERLAND, C.; O'BRIEN, R M.; GRANNER, D K. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.**, v. 351, p. 191-199, 1996.

SZABO, A.; SZABO, A J. Studies on the nature and mode of action of the insulin-sensitive glucoregulator receptor in the central nervous system. **Diabetes.**, v. 24, p. 328-336, 1975.

SZABO, A J.; IGUCHI, A.; BURLESSON, P D.; SZABO, O. Vagotomy or atropine blocks hypoglycemic effect of insulin injected into ventromedial hypothalamic nucleus. **Am J Physiol Endocrinol. Metabol.**, v. 244, p. 467-71, 1983.

TAKAHASHI, A.; ISHIMARU, H.; IKARASHI, Y, KISHI.; MARUYAMA, Y. Effects of hepatic nerve stimulation on blood glucose and glycogenolysis in rat liver: Studies with in vivo microdialysis. **J. Aut. Nerv. Syst.**, v. 61, p. 181-185, 1996.

UYAMA, N.; GEERTS, A.; REYNAERT, H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. **Anatom Record.**, v. 280, p. 808-820, 2004.

VIRKAMÄKI, A.; UEKI, K.; KAHN, C R. Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 103, p. 931-943, 1999.

WASSERMAN, D H. Four grams of glucose. **AM. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, p. 11-21, 2009.

WERTHER, G A.; HOGG, A.; OLDFIEL, B J.; MCKINLEY, M J.; FIGDOR, R.; ALLEN, A M.; MENDELSON, F A O. Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using *in vitro* autoradiography and computerized desintometry. **Endocrinology**, v. 121, p. 1562-7150, 1987.

WHITE, B A. Os sistemas endócrino e reprodutor: regulação hormonal do metabolismo energético. In: Koeppen, MB; Stanton, BA. (Org.) **Berne & Levy Fisiologia**. Rio de Janeiro. Elsevier. 2009. p. 669-700.

WHITE, M F. The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, v. 40, p. 2-17, 1997.

YANG, J W.; RAIZADA, M K.; FELLOWS, R E. Effects of insulin on cultured rat brain cells: stimulation of ornithine decarboxylase activity. **J Neurochem.**, v. 36, p. 1050-1077, 1981.

ZHAO, H.; WANG, G.; ZHANG, M.; TONG, W.; ZHANG, Y. Prehypertension and insulin resistance among Mongolian people, Inner Mongólia China. **Blood Press.**, v. 20, p. 98-103, 2011.

ZHAO, W; CHEN, H; XU, H; MOORE, E; MEIRI, N; QUON, MJ; ALKON, DL. Brain Insulin Receptors and Spatial Memory. **J Biol Chem.**, v. 274, p. 34893–34902, 1999.