



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

**Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidante y la vía
de señalización de la AMPK en hipotálamo de ratas
Wistar con hiperglucemia**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

JUAN MIGUEL MENDOZA BELLO

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. MÓNICA ESPINOZA ROJO**

CHILPANCINGO DE LOS BRAVO, GRO., ENERO 2022.





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 24 días del mes de mayo del año dos mil veintiuno, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidante y la vía de señalización de la AMPK en hipotálamo de ratas wistar con hiperglucemia", presentada por el alumno Juan Miguel Mendoza Bello, para obtener el Grado de Doctor 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. Gloria Fernández Tilapa

Dr. Alejandro Millán Vega

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dra. Penélope Aguilera Hernández

Vo. Bo



FCQB / Coordinación del
Doctorado en Ciencias
Biomédicas
DIRECCIÓN 2016-2021
Dra. Gloria Fernández Tilapa
Directora del Doctorado en Ciencias
Biomédicas



Vo. Bo UAGro
Facultad de Ciencias
Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2016-2021
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.

Bajo la dirección de:

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Y con la asesoría de:

Dra. Penélope Aguilera Hernández

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Alejandro Millán Vega

Este trabajo fue financiado por CONACYT con el número de proyecto: 269889.

Durante el periodo en que cursó el Doctorado en Ciencias Biomédicas, el C. Juan Miguel Mendoza Bello, recibió beca CONACYT (febrero 2017-enero 2020) con número de beca: 332785.

Índice

Resumen	1
Introducción	
Resultados	
Capítulo I	7
La activación de la AMPK hipotalámica por estrés oxidativo está relacionada con hiperfagia en ratas diabéticas	
Capítulo II	
Efecto <i>ex vivo</i> del resveratrol sobre el estrés oxidativo y la AMPK hipotalámica en ratas Wistar con hiperglucemia	17
Discusión	35
Referencias	39

Resumen

Durante la diabetes mellitus (DM), hay un aumento de los niveles de glucosa en sangre, una elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo (EO). La relación entre el EO y la fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), una quinasa que regula las señales que inducen el apetito y la saciedad en el hipotálamo, ha sido poco estudiada. En este estudio se utilizaron ratas Wistar con DM, inducida con estreptozotocina (60 mg/kg). Los animales fueron divididos en 4 grupos: 7, 14, 28 días con DM (7D, 14D y 28D), y su respectivo control (C). Se calculó la ingesta de alimentos para determinar la hiperfagia. Se extrajo el hipotálamo para evaluar marcadores del EO (Glutación peroxidasa y malondialdeído) por espectrofotometría; se determinó la fosforilación de AMPK, la expresión del receptor de ghrelina (GHS-R1a), del receptor de insulina (RI) y de Neuropeptido Y (NPY) por Western blot. Se observó un aumento significativo del consumo de alimentos en los grupos experimentales. El nivel de malondialdeído (MDA) disminuyó en el grupo 7D (33%) y aumentó significativamente en el grupo 28D (90%), la actividad de la enzima glutación peroxidasa (GPx) aumentó en el grupo 7D (70%) y disminuyó en el grupo 28D (34%) y la fosforilación de la AMPK aumentó significativamente en el grupo 28D (86%). En condiciones *ex vivo*, en animales con 28 días de hiperglucemia, la actividad de la Gpx aumentó en un 195%, el nivel de MDA disminuyó en un 87%, la fosforilación de la AMPK disminuyó en un 53% y la expresión de GHS-R1a disminuyó en un 66%, al tratar el tejido hipotalámico hiperglucémico con un antioxidante. La expresión del RI no se observan cambios significativos en ninguna de las condiciones. La expresión del NPY aumenta en la hiperglucemia, y el tratamiento con antioxidantes no regula el aumento de la expresión de este neuropéptido orexígeno. En conclusión, la activación de la AMPK se relaciona con el aumento de los marcadores de estrés oxidativo en ratas hiperglucémicas e hiperfágicas.

Introducción

La principal zona del sistema nervioso central (SNC) que regula la conducta alimentaria es el hipotálamo, el cual se localiza alrededor del tercer ventrículo, por debajo del tálamo y arriba de la eminencia media. El hipotálamo se divide en diversos núcleos: núcleo arcuato (ARC), núcleo paraventricular (PVN), núcleo ventromedial (VMH), núcleo dorsomedial (DMH) y área lateral (LH), siendo el ARC, el área que recibe las señales de la periferia (Roh and Kim, 2016).

La conducta alimentaria se regula a partir de señales derivadas de órganos periféricos y de señales centrales derivadas del hipotálamo (Valassi et al., 2008). Dichas señales se definen como señales orexigénicas (inhibidoras del apetito) y anorexigénicas (activadoras del apetito).

Dentro de las señales periféricas se encuentra la grelina, secretada en el estómago, la cual al activar a su receptor (GHS-R1a) en el hipotálamo, induce la expresión de neuropéptidos orexigénicos como neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con Agouti (AgRP). En tanto que la leptina e insulina, secretadas en tejido adiposo y páncreas respectivamente, al activar a sus respectivos receptores en el hipotálamo (LepR e IR) tienen un efecto anorexigénico (Thon et al., 2016; van Swieten et al., 2014), ya que estimulan la expresión de neuropéptidos anorexigénicos como proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito relacionado con cocaína y anfetaminas (CART).

Cuando estas hormonas se unen a su respectivo receptor en el hipotálamo inducen cascadas de señalización, las cuales convergen en la activación de la cinasa activada por AMP (AMPK) la principal señalización que induce un aumento o disminución de la expresión de las moléculas neuropeptídicas (Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004), Hahn et al., 1998; Huynh et al., 2016).

AMPK es una enzima heterotrimérica compuesta por una subunidad catalítica denominada α , y por dos subunidades reguladoras β y γ . Las subunidades α y β existen en 2 isoformas ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$ respectivamente) y la subunidad γ en 3 isoformas ($\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$). Esta enzima tiene una actividad de cinasa serina/treonina y es considerada

como sensor celular de energía, ya que responde a los niveles de AMP en relación a los niveles de ATP y tiene como efecto regular el metabolismo celular en diferentes tejidos (Hardie et al., 2012).

Se ha demostrado que la AMPK es un sensor importante de la homeostasis energética en hipotálamo, ya que la señalización activada por las hormonas reguladoras del apetito converge en esta cinasa. Por una parte, leptina e insulina inhiben la actividad de AMPK, en tanto que la grelina aumenta la actividad de AMPK, lo que resulta en el aumento o disminución de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos o anorexigénicos (Huynh et al., 2016; Lim et al., 2010; Oh et al., 2016; Yang et al., 2010).

Cuando la grelina llega al hipotálamo y se une a su receptor, induce la producción de glicerol (DAG) y fosfoinositol trifosfato (IP₃), mediado por la activación de la fosfolipasa C. IP₃ se une su receptor IP3R que se encuentra en el retículo endoplasmático induciendo la liberación y aumento de Ca²⁺ intracelular, lo que lleva a la activación de la proteína cinasa cinasa 2 dependiente de calcio/calmodulina (CaMKK2) la cual fosforila en treonina 172 a AMPK para activarla (Dickson et al., 2013; Huynh et al., 2016). AMPK activa factores de transcripción, uno de ellos es la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB), dicho factor se une a los promotores de los genes de *AgRP* y *Npy* (neuropéptidos orexigénicos) e induce un aumento en la expresión de estos neuropéptidos (Anamthathmakula et al., 2015; Minokoshi et al., 2004; Thomson et al., 2008). Otro factor de transcripción que es activado por AMPK y que aumenta la expresión de *AgRP* y *Npy* es FoxO1. AMPK fosforila a FoxO1 en Ser^{413/588} provocando su traslocación al núcleo, el aumento de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos (Ren et al., 2012) y la disminución de la expresión del neuropéptido anorexigénico *POMC* (Ma et al., 2015).

Por otra parte, la unión de leptina o insulina a sus respectivos receptores, evita que AMPK sea activada (Varela and Horvath, 2012). Ambas hormonas activan la vía de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3K/Akt) y de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTor), resultando en la activación de la cinasa P70-S6 que reconoce y fosforila a la AMPK en sitios de Serina^{485/491}, provocando que LKB1 o CaMKK2 no sean capaces de reconocer y fosforilar a la AMPK, lo que genera disminución en la

expresión de los neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP (Dagon et al., 2012). Además, la leptina regula la vía de JAK/STAT, activando a la proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3 (STAT3), la cual tiene sitios de unión en el promotor del gen de POMC (Gamber et al., 2012) y de CART (Maniscalco and Rinaman, 2014) aumentando su expresión. Por otra parte STAT3 regula negativamente al promotor del gen de AgRP (Varela and Horvath, 2012).

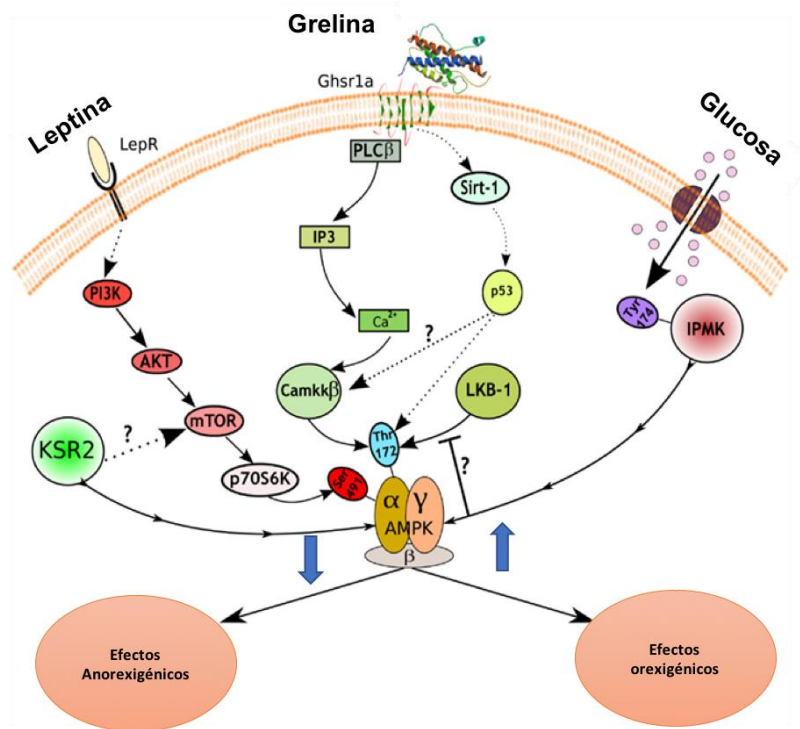


Figura 1. Regulación de la AMPK en el hipotálamo. (Modificado de Claret and Schneeberger, 2012)

En condiciones fisiológicas normales, cuando la glucosa entra a la célula, se metaboliza mediante la glicolisis, obteniendo piruvato. El piruvato entra a la mitocondria y se incorpora al ciclo de Krebs para generar nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y flavin adenina dinucleótido (FAD), que participan en la fosforilación oxidativa para la producción de ATP. Una parte del oxígeno que no es utilizado en la fosforilación oxidativa, es convertido a radicales libres de superóxido (O_2^-), especie reactiva de oxígeno (ERO) y precursor de otras EROs, como el radical hidroxilo (OH^\cdot) y de especies no radicales, como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Evans et al., 2002; Kamata and Hirata, 1999). Las EROs funcionan como segundos

mensajeros, pero en exceso pueden causar daño a las biomoléculas. Por eso, las células mantienen un equilibrio entre la generación y eliminación de las EROs por el sistema antioxidante endógeno, constituido por enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa, entre otros (Lee et al., 2004). Las EROs en el hipotálamo regulan las respuestas anorexigénicas y orexigénicas de manera diferencial (Drougard et al., 2015). Por una parte, la insulina aumenta la producción de O_2^- mediante la activación de las NADPH oxidasas, a su vez estas especies potencian la activación de la vía de la insulina en hipotálamo de ratones, ya que aumentan la autofosforilación del receptor de insulina y la activación de la vía PI3K/Akt (Onoue et al., 2016) y el aumento en la fosforilación de la STAT3 (Diano et al., 2011) activando los mecanismos mediados por la insulina y leptina (respectivamente) anteriormente mencionados (Onoue et al., 2016). De manera contraria, cuando existe disminución de las EROs se reduce la expresión de los neuropéptido POMC (Diano et al., 2011) y aumenta la expresión de los neuropéptidos NPY y AgRP (Andrews et al., 2008).

Se ha reportado que en la diabetes mellitus existe un descontrol en la homeostasis energética, derivado de altos niveles de glucosa sanguínea. En consecuencia, existe aumento de la glicolisis, lo que induce un aumento en la producción de EROs, así como disminución del sistema de defensa antioxidante endógeno, lo que se define como estrés oxidativo. El estrés oxidante es capaz de dañar a organelos celulares como el retículo endoplasmático y la mitocondria, principales reservorios de calcio, ocasionando que este se libere y aumente la actividad de CaMKK2 y la fosforilación de AMPK y de esta manera aumenta la actividad de esta enzima aumenta la expresión de los neuropéptidos orexigénicos (Zündorf and Reiser, 2011). Otro mecanismo donde participa las EROs, es en la activación del factor de transcripción FoxO1 que también aumenta la expresión de *Npy* y *AgRP* (Yasrebi et al., 2016) y disminuye la de POMC (Ma et al., 2015). Es decir, el estrés oxidativo provoca el aumento en la expresión de neuropéptidos orexigénicos y la disminución de los neuropéptidos anorexigénicos.

Esta situación puede simularse en modelos diabéticos inducidos con estreptozotocina, en los que se ha observado un aumento en los niveles séricos de grelina (Ishii et al., 2002), que puede llevar a la activación de la AMPK y del factor de transcripción CREB

(Fisslthaler and Fleming, 2009) presentando un incremento en la expresión de *Npy* y *AgRP*, teniendo como consecuencia el aumento del apetito (Dong *et al.*, 2006; Havel *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2012).

Considerando que el estrés oxidante afecta vías de señalización en hipotálamo, se han utilizado antioxidantes exógenos con la finalidad de disminuir el estrés oxidante y restablecer dichas señales (Modak *et al.*, 2007). El Resveratrol (RSV), es una fitoalexina natural encontrada principalmente en las uvas y un potente antioxidante (Keylor *et al.*, 2015). Ko *et al.*, en 2015, reportó que una concentración de 20 μM de RSV es capaz de reducir EROs y productos finales de la glicosilación avanzada, generados en la línea celular neuronal SH-SY5Y. Además, el tratamiento con 25, 50 y 100 μM de RSV en la línea celular 3T3-L1, induce la fosforilación y activación de AMPK (The¹⁷²) (Chen *et al.*, 2015). La disminución de la producción de las EROs generada por el tratamiento con 100 mg/kg de RSV se relaciona con la inhibición en la activación de la AMPK en tejido cerebral de ratas con estrés oxidante inducido con fructosa (Cheng *et al.*, 2014). Esta misma dosis de RSV induce saciedad en ratones C57BL/6, a las 48 h después de la inyección por vía intraperitoneal (Kim *et al.*, 2010), es decir se simula el efecto de las hormonas insulina y leptina. En DM no se ha descrito el papel del estrés oxidativo sobre la regulación de las moléculas que regulan la ingesta de alimento. Conocer los mecanismos que están implicados en la regulación de la ingesta de alimentos y si el EO y los antioxidantes regulan estos mecanismos, nos abre un nuevo panorama para entender procesos que pueden ser regulados durante la DM. Por lo anterior, el propósito de este estudio fue evaluar el estrés oxidativo su el efecto sobre la AMPK en tejido hipotalámico de ratas con DM (ensayos *in vivo* y *ex vivo*), así como moléculas rio arriba y abajo en la señalización de la AMPK.

CAPÍTULO I

**La activación de la AMPK hipotalámica por estrés oxidativo
está relacionada a hiperfagia en ratas diabéticas**

The activation of hypothalamic AMP-activated protein kinase by oxidative stress is related to hyperphagia in diabetic rats

Juan M. Mendoza-Bello^a, Martha I. Barragán-Bonilla^a,
Mónica Ramírez^b, Eugenia Flores-Alfaro^c, Alejandro Millán-Vega^d,
Juan Parra-Abarca^a and Mónica Espinoza-Rojo^a

Objective During diabetes, there are increased blood glucose levels and oxidative stress. The relationship between oxidative stress and the phosphorylation of AMP-activated protein kinase at the hypothalamic level has been little studied. The objective of this study was to analyze the relationship between oxidative stress and AMP-activated protein kinase activation in Wistar rats with hyperphagia and hyperglycemia.

Methods Rats at 7, 14, and 28 days with diabetes were used. Control rats were included. Food intake was calculated to determine hyperphagia. The hypothalamus was extracted to evaluate oxidative stress markers by spectrophotometry; phosphorylation of AMP-activated protein kinase, growth hormone receptor 1a, and neuropeptide Y expression were determined by Western blot.

Results There was a significant increase in the consumption of food in the experimental groups. The level of malondialdehyde decreased in the 7-day group (33%) and increased significantly in the 28-day group (90%), glutathione peroxidase activity increased in the 7-day group (70%) and decreased in the 28-day group (34%), and the phosphorylation of AMP-activated protein kinase increased significantly in the 28-day group (86%). Under ex-vivo conditions in animals with 28

days of hyperglycemia, glutathione peroxidase activity increased 195%, the malondialdehyde level decreased 87%, phosphorylation of AMP-activated protein kinase decreased 53%, and growth hormone receptor 1a expression decreased 66%, when treating hyperglycemic hypothalamic tissue with an antioxidant. NPY expression increased in hyperglycemia, and antioxidant treatment did not regulate its expression.

Conclusions The activation of AMP-activated protein kinase is related with an increase in oxidative stress markers in hyperglycemic and hyperphagic rats. *NeuroReport* 33: 72–80 Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

NeuroReport 2022, 33:72–80

Keywords: AMP-dependent kinase, diabetes, food intake, oxidative stress

^aLaboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, ^bConsejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), ^cLaboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas and ^dLaboratorio de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Guerrero, Mexico

Correspondence to Mónica Espinoza-Rojo, PhD, Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria, 39090 Chilpancingo de los Bravo, Gro., México
Tel: +52 747 471 9310 x3600; e-mail: monicaespinoza@uagro.mx

Received 11 October 2021 Accepted 19 November 2021

Introduction

The AMP-activated protein kinase (AMPK) has been considered a cellular energy sensor; this kinase regulates cellular metabolism in different tissues. Centrally, AMPK regulates hormone-activated peripheral signals to maintain energy balance and eating behavior [1]. The regulation of eating behavior occurs at the central level in the hypothalamus, where the expression of neuropeptides is regulated as follows: those that induce appetite, including neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (AgRP), and those that induce satiety, including proopiomelanocortin (POMC) and transcript regulated by cocaine/amphetamine (CART) [2]. To stimulate the appetite, ghrelin, an orexigenic hormone, is released from the stomach, it reaches the hypothalamus through the bloodstream to bind to the growth hormone receptor 1a (GHS-R1a); this stimulates phospholipase C, producing diacyl glycerol, and phosphoinositol triphosphate (IP3).

IP3 is a second messenger that binds to its receptor (IP3R) in the endoplasmic reticulum and causes the release of Ca²⁺ into the cytosol [3]. On increasing Ca²⁺, the calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKKII) is activated, which phosphorylates AMPK in the threonine 172 residue. AMPK activates transcription factors such as the cAMP-response element binding protein (CREB) and the Forkhead box protein O1, which act on the promoter region of *NPY* and *AgRP* genes, promoting their expression and inducing appetite [4,5]. To achieve energy balance and stimulate satiety, leptin and insulin are secreted by the adipose tissue and the pancreas, respectively. The binding of both hormones to their respective receptors (LepR, for leptin and IR for insulin) in the hypothalamus triggers the activation of the PI-3K/AKT pathway that promotes the activation of the mammalian target of rapamycin/P70-S6 kinase, which is capable of phosphorylating AMPK at serine 485/491 sites, reducing the ability of

CaMKKII to phosphorylate AMPK and resulting in the low expression of NPY and AgRP and decreased appetite [6]. In addition, when leptin binds to a receptor, it triggers the activation of the JAK/STAT pathway, and consequently, the activation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3); this protein is a transcription factor that binds to the *POMC* gene promoter to induce its expression and stimulating satiety [7]. STAT3 also acts on the promoters of the *AgRP* [8] and *NPY* [9] genes to decrease their expression, negatively regulating appetite signals. Any alteration to the regulation of appetite satiety can generate the excessive need to consume food (hyperphagia) or the lack of appetite (anorexia). In metabolic diseases such as diabetes, the prevalence of hyperphagia aggravates the diabetic condition [10]. In streptozotocin-induced diabetic models, an increase in serum ghrelin levels [11,12], AMPK overactivation [13], and increased the expression of *NPY* and *AgRP* and, therefore hyperphagia, has been observed [11,14]. This increase in food intake aggravates the hyperglycemia, and through glycolysis, increases the production of reactive oxygen species (ROS) and decreases endogenous antioxidant defenses, which is denominated oxidative stress. During oxidative stress, there is damage to macromolecules, such as lipids, proteins, and DNA, giving rise to alterations in cell signaling pathways and gene expression [15]. It has been reported that oxidative stress can cause neuroinflammation and neurodegeneration and that AMPK activity is closely related to these damaging effects at brain level [16].

However, little is known about the relationship between oxidative stress in the hypothalamus and AMPK activation in the progression of diabetes. Therefore, the objective of this study was to analyze the relationship between oxidative stress and AMPK activation at the hypothalamic level in Wistar rats with hyperphagia and hyperglycemia.

Methods

Animal model

Male rats of the Wistar strain (n = 4–6) obtained from the Bioterium of the Facultad de Ciencias Químico Biológicas of the Universidad Autónoma de Guerrero, 8 weeks of age, and with an approximate weight of 250–300 g, were used. They were treated 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 Universidad Autónoma de Guerrero with document No. 01/CICUAL. The animals were placed in individual boxes, with free access to water and standard food (LabDiet 5001, St. Louis, Missouri, USA). They were kept under a 12-hour light/dark cycle. The experiment was divided into 3 times/groups: 7, 14, and 28 days. Each of the groups was subdivided into 2 groups as follows: the control group and the group with diabetes. To induce diabetes, a single dose of 60 mg/kg

intraperitoneal (i.p.) streptozotocin was administered (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). After 48 hours of streptozotocin administration, the blood glucose level was determined using test strips and the OneTouch glucometer (LifeSpan, Inc, Milpitas, California, USA). Rats with blood glucose levels above 250 mg/dL were included in the diabetes group. After 7 (group 7 day), 14 (group 14 day), or 28 (group 28 day) days, glucose concentrations were determined. The animals were sacrificed for dissection of the hypothalamus to determine the activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx), the level of malondialdehyde that defines oxidative damage to lipids by ROS, and AMPK activation.

Body weight and food intake

Daily body weight (BW) was determined at a certain fixed time. The amount of food consumed was measured daily. Daily food intake was adjusted for each 100 g of the BW of each animal.

Dissection of the hypothalamic tissue

The animals were sedated with sodium pentobarbital (120 mg/kg i.p., according to NOM-062-ZOO-1999) and sacrificed by decapitation to obtain hypothalamic tissue. The hypothalamic tissue was separated into 2 fragments. One fragment was homogenized in 0.067 M phosphate buffer pH 7.0 for determination of the malondialdehyde level and of GPx activity. The other fragment was utilized for the extraction of total proteins, this fragment was dissolved in RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, and 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.5) supplemented with sodium pyrophosphate and protease/phosphatase inhibitors for the determination of AMPK phosphorylation.

Ex-vivo assay

To determine whether the phosphorylation of AMPK at 28 days is a direct consequence of oxidative stress, we used an ex-vivo assay, in which direct treatment with an antioxidant (resveratrol, Sigma Aldrich) was performed to counteract the oxidative effect.

Animals were induced into hyperglycemia as described previously. At the end of 28 days of hyperglycemia, the hypothalamus of the rats was obtained, which was fragmented, using the McIlwain Tissue Chopper apparatus, to obtain slices of 300 µm of hypothalamic tissue. Subsequently, the sections were maintained at 37 °C in oxygenated Krebs Heinsleit medium (124 mM NaCl, 0.76 mM KCl, 1.24 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM Glucose, 26 mM Tris-HCl pH 7.4) to guarantee the conditions of cell viability. Oxidative stress markers were determined under these conditions, and the treatment with resveratrol was carried out (50 µM of resveratrol, diluted in dimetilsulfóxido <1%) [17]. The tissues were stimulated with the antioxidant for 120 min

[18] with a previous adaptation of 60 min, at 37 °C. At the end of the stimulation, the hypothalamic tissue was separated into 2 tubes. To determine the oxidative stress, the tissue from the first tube was homogenized in phosphate buffer (0.067 M, pH 7.0) and centrifuged at 3000 rpm to obtain the supernatant; and the tissue in the second tube was homogenized in RIPA lysis buffer for the extraction of total proteins.

Malondialdehyde level

The level of malondialdehyde in the hypothalamus (*in vivo* and *ex vivo*) was determined from 200 μ l of the supernatant of the tissue that contained 0.067 M phosphate buffer pH 7.0; this solution was added together with 650 μ l of 1-methyl-2-phenylindole at a concentration of 10 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and 150 μ l of 37% HCl. The mixture was incubated for 40 min at 45 °C and centrifuged at 7000 rpm for 10 min. The malondialdehyde level was determined from the supernatant by spectrophotometry on Nanodrop 2000c at 586 nm. 1, 1, 3,3-Tetramethoxypropane [Malondialdehyde bis (dimethyl acetal)] (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) was used as standard. The results were adjusted with the total protein concentration.

Quantification of glutathione peroxidase activity

To determine GSH-Px/GPx activity, 50 μ l of the supernatant was taken of the tissue that contained 0.067 M phosphate buffer pH 7.0 and was mixed with 800 μ l of redox solution (50 mM phosphate buffer pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM sodium azide, 0.2 mM NADPH, 1 U/ml glutathione reductase, and 1 mM reduced glutathione). This was immediately incubated for 5 min at 37 °C. After this, 100 μ l of H₂O₂ (0.25 mM) was added, mixing by inversion. Three readings were carried out (every 1 min) by spectrophotometry on Nanodrop 2000c at 340 nm. The absorbance changes were averaged, the mM absorption coefficient of NADPH at 340 nm was employed to quantify the activity, and the results were adjusted per mg of protein.

Western blot

Total protein concentration was determined by the Bradford method. Ten percent of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed with 20 μ g of total protein diluted in sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 10% β -mercaptoethanol). The proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. For detection of the proteins-of-interest, the following antibodies were utilized: rabbit mAb to p-AMPK α 1/2 (Thr172) (1:2000) (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA); rabbit polyclonal antibody to AMPK (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA); rabbit mAb NPY (1:3000) (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA); rabbit polyclonal antibody to GHS-R1a (1:2,000)

(ABCAM, Cambridge, UK); rabbit mAb to GAPDH (1:2,000) (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA), and horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit polyclonal antibody (1:10000) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA). The immune complexes were detected using Immobilon (Bio-Rad, Hercules, California, USA) and with the ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Statistical analysis

Differences with respect to the control groups were determined with the Student *t* test. Data were plotted as the arithmetic mean and SD using the GraphPad Prism ver. 7 statistical software program. Values of *P* < 0.05 were considered significant.

Results

Blood glucose level, body weight, and food intake

To determine the diabetic condition of the animals at 7, 14, and 28 days after being diagnosed with diabetes, blood glucose level, BW, and food intake were determined.

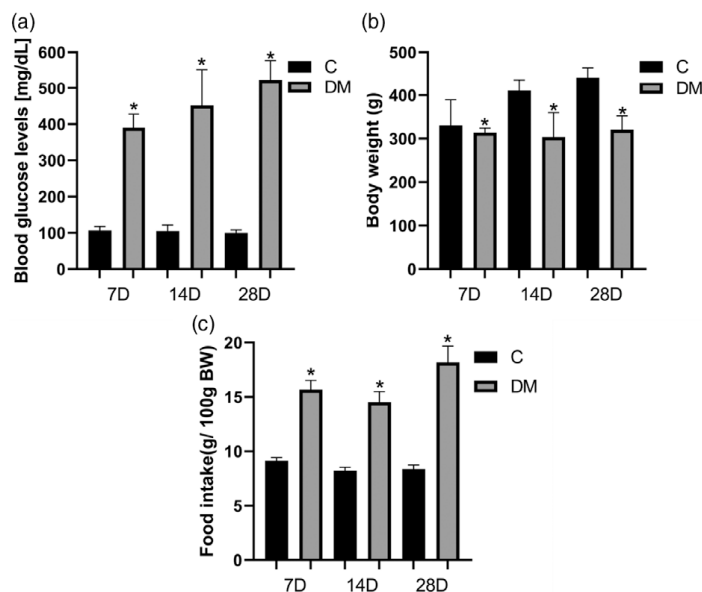
The blood glucose level increased significantly (*P* < 0.05), 390 \pm 38, 451 \pm 100, and 524 \pm 53 mg/dL in rats with 7 (the 7-day group), 14 (the 14-day group), or 28 days (the 28-day group) with diabetes, respectively, compared to their respective control group (107 \pm 11, 105 \pm 17, and 100 \pm 9 mg/dL) (Fig. 1a). BW increased gradually in these control groups (330 \pm 59, 410 \pm 25, and 442, respectively); however, animals with diabetes did not gain weight (Fig. 1b).

To determine whether diabetes affected feeding behavior in diabetic animals during the established times, daily food intake was monitored. We observed that, despite that the hyperglycemic animals did not gain weight (Fig. 1b), their food consumption was significantly higher (15.7 \pm 0.3, 14.5 \pm 0.9, and 18.2 \pm 1.5 g/100 g BW, respectively) compared with the respective control group (9.1 \pm 0.3, 8.2 \pm 0.2, and 8.3 \pm 6 g/100 BW, respectively) (Fig. 1c).

Diabetes generates oxidative stress and the phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the hypothalamus of wistar rats

To analyze the oxidative damage, the enzymatic activity of GPx, as well as the level of malondialdehyde, a product of lipid oxidation, were determined. GPx activity and malondialdehyde level were measured in the hypothalamic tissue of the different diabetes time groups. After 7 days of diabetes, GPx activity increased 70% and the malondialdehyde level decreased 33% compared with the control group (Fig. 2a,b). The level of phosphorylation of AMPK, an important food-intake regulator, significantly increased 54% (*P* > 0.05) compared with the control group (Fig. 2c,d). At 14 days, no significant changes were observed in GPx activity, malondialdehyde levels, and the AMPK phosphorylation level (Fig. 2,e-h). At 28 days

Fig. 1



Comparison of blood glucose level, body weight (BW), and food intake in rats with 7, 14, and 28 days with diabetes (DM). (a) Glucose levels, (b) BW, and food intake (c) were evaluated at the end of each of the 7, 14, and 28 days. C, control. Data are expressed as mean \pm SD, n = 4–6. * $P < 0.05$ vs C group.

of diabetes, the percentage in GPx activity decreased 34% ($P < 0.05$) (Fig. 2i) and the percentage of malondialdehyde increased 90% ($P < 0.05$) (Fig. 2j) compared with the control group. During this time, the level of AMPK phosphorylation increased significantly, that is, 86% ($P < 0.05$) (Fig. 2k,l) compared with their respective control group, considering that, during this time (28 days), the oxidative damage (malondialdehyde level) had overcome antioxidant defenses (GPx activity), and the phosphorylation of AMPK increased again. We decided to define whether AMPK phosphorylation is due to the effect of oxidative damage per se; therefore, we used an *ex-vivo* assay. To carry out the latter, the extracted hypothalamic tissue was treated with an antioxidant to reverse the oxidative effect on lipids, and the effect on enzymatic activity on AMPK phosphorylation.

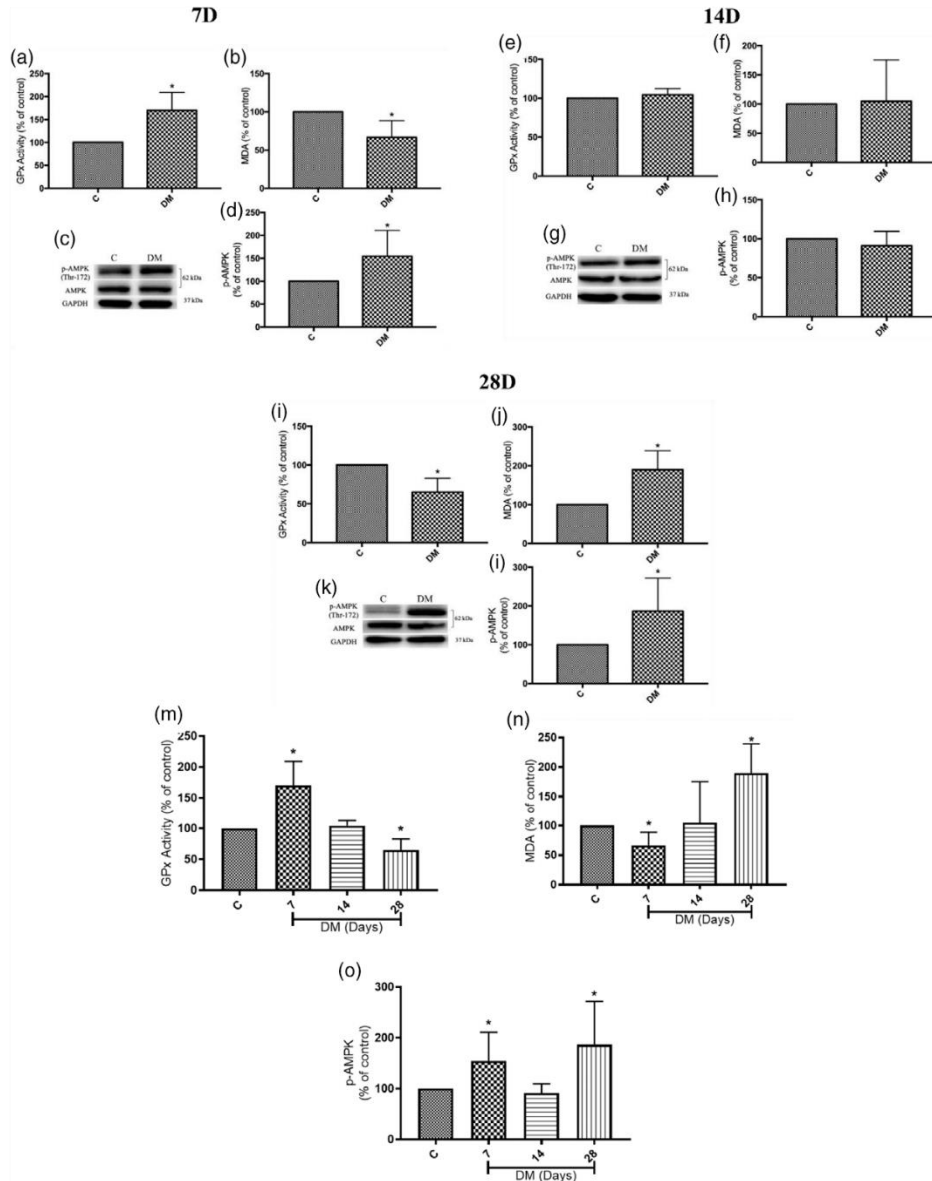
Oxidative damage and phosphorylation of AMP-activated protein kinase in hypothalamus is decreased with *ex-vivo* antioxidant treatment

To confirm whether oxidative stress has direct implications on AMPK activation, we analyzed the effect of treatment *ex vivo* with resveratrol, which is a powerful antioxidant, on malondialdehyde level, GPx activity, and on the level of phosphorylation of AMPK in the

hypothalamic tissue of rats with hyperglycemia and hyperphagia of 28 days. The treatment was carried out under *ex-vivo* conditions to guarantee the effect of the concentrations employed (50 μ M) in the brain tissue.

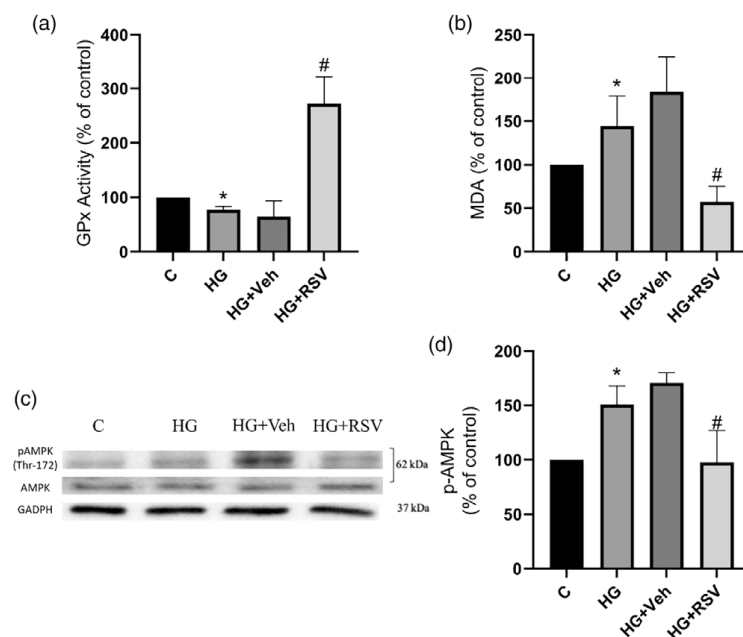
In the group with hyperglycemia, GPx activity decreased 23% (Fig. 3a), the malondialdehyde level increased 44% (Fig. 3b), and the phosphorylation of AMPK increased 50%, compared with the control group (Fig. 3c,d). These results coincide with those described previously (*in vivo*). When hyperglycemic tissue was treated with resveratrol (hyperglycemia + resveratrol), we found that the malondialdehyde level decreased 87% (Fig. 3b) and that GPx activity increased 195%, (Fig. 3a) compared with the hyperglycemia group. Also, the treatment with resveratrol induced a decrease of 53% of AMPK phosphorylation compared with that of the group with hyperglycemia (Fig. 3c,d). Therefore, the increase in oxidative damage markers (increase in malondialdehyde level and decrease in GPx activity) coincides with an increase in AMPK phosphorylation, but treatment with the antioxidant was able to neutralize this effect by inducing an increase in GPx activity, decreasing the level of malondialdehyde and decreasing AMPK phosphorylation.

Fig. 2



Activity of glutathione peroxidase (GPx) and levels of malondialdehyde (MDA) and p-AMP-activated protein kinase (AMPK) protein in hypothalamus of rats with 7, 14, and 28 days with diabetes (DM). GPx activity and the MDA levels in the hypothalamus were determined by spectrophotometry in rats with 7 (a and b), 14 (e and f), and 28 (i and j) days with DM. The p-AMPK/AMPK protein levels in the hypothalamus were detected by immunoblotting and the data were normalized with respect to GAPDH in rats with 7 (c), 14 (g), and 28 days (k). Density analysis of p-AMPK/AMPK/GAPDH was performed (d, h, and l). C, control. Data are expressed as mean \pm SD, $n = 4-6$. * $P < 0.05$ vs. C group.

Fig. 3



Activity of glutathione peroxidase (GPx), and levels of malondialdehyde (MDA) and p-AMP-activated protein kinase (AMPK) protein in the hypothalamus of hyperglycemic (HG) rats with ex-vivo treatment with Resveratrol (RSV). Determination of (a) GPx activity and (b) MDA levels in the hypothalamus by spectrophotometry. (c) p-AMPK/AMPK protein levels in the hypothalamus from different groups as detected by immunoblotting. Data were normalized with respect to GAPDH. (d) Density analysis of p-AMPK/AMPK/GAPDH from hypothalamus of different groups. C, control; HG+RSV, hyperglycemic and resveratrol; HG+Veh, hyperglycemic and vehicle. Data are expressed as mean \pm SD, $n = 4-6$. * $P < 0.05$ vs. C group, # $P < 0.05$ vs. HG group.

Protein levels of the growth hormone receptor 1a and neuropeptide Y in the hypothalamus of hyperglycemic rats with ex-vivo treatment with resveratrol

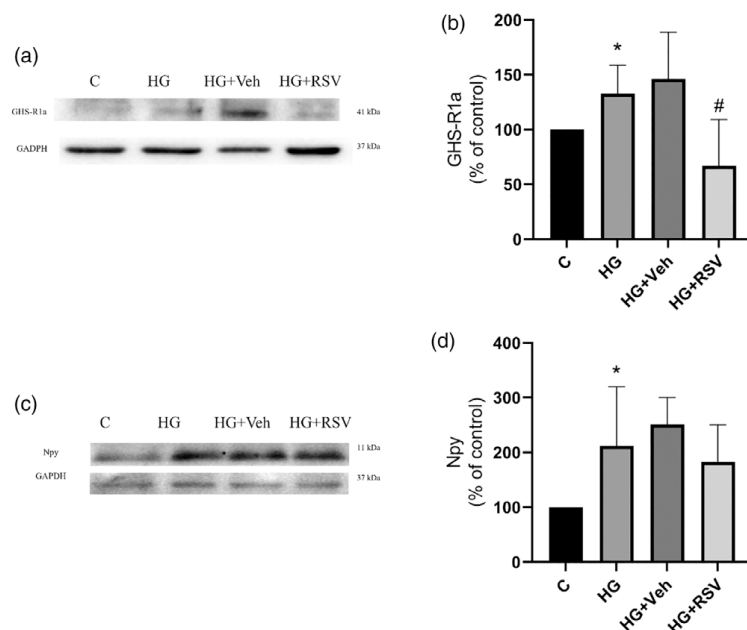
The mechanism that induces hyperphagia initially occurs by means of the activation of the receptors of orexigenic hormones in the hypothalamus, such as GHS-R1a. Activation of this G-protein-coupled receptor induces the activation of AMPK for the subsequent expression of orexigenic neuropeptides such as NPY. The latter is an orexigenic neuropeptide whose expression is regulated by AMPK signaling. To determine the state of molecules upstream and downstream of AMPK activation, we evaluated the level of expression of the ghrelin receptor and the expression of NPY under hyperglycemic conditions and after antioxidant treatment. We found that hyperglycemia significantly increased the expression of the GHS-R1a protein, by 33% (Fig. 4a,b), which is related to a 112% increase in the expression of NPY (Fig. 4c,d) under the same hyperglycemic conditions. Coincidentally, resveratrol treatment significantly decreased GHS-R1a expression (by 66%) (Fig. 4a,b), although the antioxidant

did not induce significant changes in NPY expression, compared with the group with hyperglycemia (Fig. 4c,d).

Discussion

Hyperphagia in diabetic animals is due to alterations in the signals that regulate appetite between the hypothalamus and peripheral organs [19,20]; it has been reported that alterations in signaling induced by leptin (anorexigenic hormone) in the hypothalamus promotes hyperphagia and obesity in mice with diabetes [12,20]. This has been related to the decrease in the concentration of leptin in plasma, a decrease in the expression of the neuropeptides POMC/CART (anorexigenic neuropeptides), and an increase of NPY/AGRP (orexigenic neuropeptides) in hyperglycemic rats induced with Streptozotocin. It is assumed that these changes depend on the severity of the hyperglycemia [21]. In our study, hyperphagia and the glycemic level gradually increased during 7, 14, and 28 days in diabetic animals, without BW gain. This occurs because, during diabetes, the absence of insulin, thus the lack of intracellular

Fig. 4



Protein levels of the growth hormone receptor 1a (GHS-R1a) and neuropeptide Y (NPY) in the hypothalamus of hyperglycemic (HG) rats with ex-vivo treatment with resveratrol (RSV). (a) GHS-R1a protein levels in the hypothalamus from different groups as detected by immunoblotting. Data were normalized with respect to GAPDH. (b) Density analysis of GHS-R1a/GAPDH from the hypothalamus of different groups. (c) NPY protein levels in the hypothalamus from different groups as detected by immunoblotting. Data were normalized with respect to GAPDH. (d) Density analysis of NPY/GAPDH from the hypothalamus of different groups: C, control, HG+RSV, hyperglycemic and resveratrol; HG+Veh, hyperglycemic and vehicle. Data are expressed as mean \pm SD, $n = 4-6$. * $P < 0.05$ vs. C group, # $P < 0.05$ vs. HG group.

signaling, prevents the function of insulin-dependent transporters (glucose transporter 4) in order to allow the entry of glucose into the cell [22]. Therefore, the cell lacks the energy derived from glycolysis and activates pathways to break down fats and obtain energy from them [23]. In this way, diabetic animals experience hyperphagia due to a lack of control in the orexigenic/anorectic signals in the hypothalamus, as demonstrated by the increase in the expression of NPY, but they fail to gain weight.

In addition, it has been reported that hyperglycemia generates the overproduction of mitochondrial ROS and a decrease in antioxidant defenses [24].

Oxidative stress possesses important implications in the hypothalamus. It is another factor that alters the signals that regulate eating behavior [25]. In the present study, the increase in hyperphagia coincided with the gradual increase of the malondialdehyde level, which is an end product of lipid peroxidation and a marker of oxidative stress. In addition, there was a gradual decrease in

the enzymatic activity of GPx, an antioxidant enzyme that metabolizes hydrogen peroxide into water using reduced glutathione as a hydrogen donor [15,16], which indicates the establishment of oxidative stress in the hypothalamus at 28 days of hyperglycemia and hyperphagia. In contrast, a few days after the onset of diabetes (7 days), GPx activity was increased, the malondialdehyde level was decreased, and the phosphorylation of AMPK was increased. Possibly during this time, moderate levels of ROS can generate an adaptive response or cellular preconditioning that will induce the functional regulation of proteins and the expression of genes. In this context, some studies reveal that ROS induce AMPK activation as part of this cellular preconditioning and favor resistance to cerebral ischemia in animal models [25,26].

In vitro, the occurrence of preconditioning to maintain the energy demand required for cell survival has also been reported in cultures of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. The cells were treated with low concentrations of H_2O_2 ; this treatment generated an

increase in cell viability, decreased ROS concentrations, and increased ATP production, these latter events related with the overexpression of erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and GPx [27]. Nrf2 is a transcription factor and master regulator of the antioxidant response, which is released and enters into the nucleus when ROS oxidizes the Keap1 protein (Nrf2 inhibitor). Another pathway of Nrf2 activation takes place when this factor is phosphorylated by protein kinases, also activated by ROS (protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinases). In this manner, Nrf2 can bind to antioxidant response elements to induce GPx expression and to regulate oxidative stress [28,29].

The increase in GPx expression at the initial stage of the disease may reflect the increase in enzyme activity found in this study, which can regulate oxidative stress and prevent the increase in the malondialdehyde level, as observed in animals with 7 days of diabetes.

Regarding the activation of AMPK, it has been reported that this kinase acts as a sensor and regulator of energy homeostasis in the brain; it has also been recognized as an antioxidant regulator. AMPK can be activated by several signals, including the increase in AMP that occurs when the level of ATP decreases due to its degradation, and by the activation of liver kinase B1 (mainly in muscle) or CaMKK2 (mainly in brain) kinases that phosphorylate and activate AMPK [4,30].

In this study, the increase in AMPK phosphorylation at days 7 and 28 (*in vivo* and *ex vivo*) after hyperglycemia may be due to the signaling exerted by ghrelin, which is the main hormone that induces hyperphagia. In addition to alterations in leptin signaling, hyperphagia takes place by activation of the expression of the orexigenic neuropeptides (NPY and AgRP) in the hypothalamus, this occurring when ghrelin is released from the stomach and activating its hypothalamic receptor (GHS-R1a) [31]; activation of this receptor promotes an increase in the level of calcium, favoring the activation of CaMKK2, which has been recognized as a kinase that phosphorylates and activates AMPK by a pathway independent of the AMP/ATP ratio [4,30].

In this context, it has been reported that i.p. or intracerebroventricular injection of ghrelin in rodents induced the phosphorylation and activation of AMPK and increased appetite, while the i.p. injection of leptin induced the opposite effect [4]. Furthermore, ghrelin treatment administered intranasally to rats with ischemic-hypoxic encephalopathy promoted AMPK phosphorylation and reduced oxidative stress [32].

On the other hand, *in-vitro* studies reveal that an increase in AMPK phosphorylation is related to the activation of Nrf2 and a decrease in oxidative stress; therefore, AMPK has been considered a molecule that favors an antioxidant environment [33]. We consider that, in our study, the increase in phosphorylation at 7 days would favor the

activity of GPx, thus the decrease in the malondialdehyde level. After 14 days, the activity of GPx, the malondialdehyde level, and the phosphorylation of AMPK had been regulated. However, at 28 days *in vivo*, as previously mentioned, hyperphagia and hyperglycemia persisted and oxidative stress was again established with the increase in the malondialdehyde level, overcoming the antioxidant defenses and consequently increasing the phosphorylation of AMPK. The downstream effect of AMPK is the activation of CREB protein; this transcriptional factor regulates genes related to neuronal differentiation and survival [16,34].

The increase in the expression of the ghrelin receptor found in our study coincides with the increase in the phosphorylation of AMPK and with that active AMPK induces NPY expression. The increase in the receptor and in the activation of AMPK may be due to the oxidative damage present, because antioxidant treatment counteracts the effect on these molecules. It was reported that oxidative stress affects signaling pathways in the hypothalamus; exogenous antioxidants were used in order to reduce oxidative stress and to restore these signals [35]. However, the antioxidant treatment did not decrease the expression of NPY. In this context, it has been shown that antioxidant treatment increases the expression of NPY in an animal model with depression [36]. Another possible mechanism is that the NYP promoter possesses a response element for the nerve growth factor, which is positively regulated by antioxidants [37]. Resveratrol at a concentration of 20 μ M is capable of reducing ROS and advancing the glycosylation end products generated in the neuronal cell line SH-SY5Y [38]. On the other hand, in the 3T3-L1 cell line resveratrol treatment (25, 50, and 100 μ M) increased AMPK phosphorylation [17]. The activation of AMPK by resveratrol is involved in the decrease in ROS production through the inhibition of NADPH oxidase in the brain tissue of rats with oxidative stress induced with fructose and treated with 100 mg/kg of resveratrol [39]; this same dose of resveratrol induced satiety in C57BL/6 mice 48 hours after i.p. injection. These results indicate that an increase in the expression of GHS-R1 is directly related to the increase in the activation of the AMPK that could be inducing the expression of NPY, and furthermore, the effect of the antioxidant on the expression of GHS-R1 (Fig. 4b) and the activation of AMPK (Fig. 3d) related to oxidative stress with hyperphagia during hyperglycemia. In conclusion, the present study shows that the increase in AMPK phosphorylation is related to oxidative stress, which normalizes when the activity of GPx is balanced in relation to the presence of malondialdehyde, but activated again when there is a redox imbalance. Therefore, the increase in the phosphorylation of AMPK increases GHS-R1 and NPY expression, and its response to stress could be related to the persistence of diabetic hyperphagia.

Acknowledgements

This work was supported by project 269889 funded by CONACyT-México. Juan M Mendoza-Bello was financed by CONACyT (scholarship no. 332785).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Minokoshi Y, Shiuchi T, Lee S, Suzuki A, Okamoto S. Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition* 2008; **24**:786–790.
- Ahima RS, Antwi DA. Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008; **37**:811–823.
- Dickson EJ, Falkenburger BH, Hille B. Quantitative properties and receptor reserve of the IP(3) and calcium branch of G(q)-coupled receptor signaling. *J Gen Physiol* 2013; **141**:521–535.
- Anderson KA, Ribar TJ, Lin F, Noeldner PK, Green MF, Muehlbauer MJ, et al. Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab* 2008; **7**:377–388.
- Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004; **279**:12005–12008.
- Dagon Y, Hur E, Zheng B, Wellenstein K, Cantley LC, Kahn BB. p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab* 2012; **16**:104–112.
- Gamber KM, Huo L, Ha S, Hairston JE, Greeley S, Bjerbaek C. Over-expression of leptin receptors in hypothalamic POMC neurons increases susceptibility to diet-induced obesity. *PLoS One* 2012; **7**:e30485.
- Varela L, Horvath TL. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* 2012; **13**:1079–1086.
- Mountjoy PD, Bailey SJ, Rutter GA. Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia* 2007; **50**:168–177.
- Amos DL, Efaw L, Cook C, Massie M, Mitchell N, Gudivada A, et al. Modulation of hypothalamic activity alters appetite in a novel antioxidant mouse. *FASEB J* 2016; **30**(Suppl 1):626.4–626.4.
- Dong J, Peeters TL, De Smet B, Moechars D, Delporte C, Vanden Bergh P, et al. Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology* 2006; **147**:2634–2642.
- Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. *Endocrinology* 2002; **143**:4934–4937.
- Namkoong C, Kim MS, Jang PG, Han SM, Park HS, Koh EH, et al. Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. *Diabetes* 2005; **54**:63–68.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005; **1**:15–25.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB III. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; **17**:24–38.
- Rehman SU, Ikram M, Ullah N, Alam SI, Park HY, Badshah H, et al. Neurological Enhancement Effects of Melatonin against Brain Injury-Induced Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegeneration via AMPK/CREB Signaling. *Cells* 2019; **8**:E760.
- Chen S, Zhou N, Zhang Z, Li W, Zhu W. Resveratrol induces cell apoptosis in adipocytes via AMPK activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **457**:608–613.
- Engström Ruud L, Pereira MMA, de Solis AJ, Fenselau H, Brüning JC. NPY mediates the rapid feeding and glucose metabolism regulatory functions of AgRP neurons. *Nat Commun* 2020; **11**:442.
- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 2001; **74**:683–701.
- Asai A, Nagao M, Hayakawa K, Miyazawa T, Sugihara H, Oikawa S. Leptin production capacity determines food intake and susceptibility to obesity-induced diabetes in Oikawa-Nagao Diabetes-Prone and Diabetes-Resistant mice. *Diabetologia* 2020; **63**:1836–1846.
- Sonoda S, Yoshimura M, Ueno H, Nishimura H, Nishimura K, Tanaka K, et al. Expression of the genes encoding hypothalamic feeding-related neuropeptides in the streptozotocin-induced diabetic rats with variable hyperglycemia and hyperphagia. *Neuropeptides* 2019; **75**:34–40.
- Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schroder HD, Handberg A. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes* 2001; **50**:1324–1329.
- Grams J, Garvey WT. Weight loss and the prevention and treatment of type 2 diabetes using lifestyle therapy, pharmacotherapy, and bariatric surgery: mechanisms of action. *Curr Obes Rep* 2015; **4**:287–302.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; **23**:599–622.
- Gyengesi E, Paxinos G, Andrews ZB. Oxidative stress in the hypothalamus: the importance of calcium signaling and mitochondrial ROS in body weight regulation. *Curr Neuropharmacol* 2012; **10**:344–353.
- Zhang J, Wang Y, Liu X, Dagda RK, Zhang Y. How AMPK and PKA Interplay to Regulate Mitochondrial Function and Survival in Models of Ischemia and Diabetes. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**:4353510.
- Garrido-Pascual P, Alonso-Varona A, Castro B, Burón M, Palomares T. H2O2-preconditioned human adipose-derived stem cells (HC016) increase their resistance to oxidative stress by overexpressing Nrf2 and bioenergetic adaptation. *Stem Cell Res Ther* 2020; **11**:335.
- Rubio V, Valverde M, Rojas E. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. *Environ Sci Pollut Res Int* 2010; **17**:369–382.
- Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**:1–18.
- Saito M, Saito M, Das BC. Involvement of AMP-activated protein kinase in neuroinflammation and neurodegeneration in the adult and developing brain. *Int J Dev Neurosci* 2019; **77**:48–59.
- Cummings DE, Foster-Schubert KE, Overduin J. Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets* 2005; **6**:153–169.
- Huang J, Liu W, Doycheva DM, Gamdzyk M, Lu W, Tang J, Zhang JH. Ghrelin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis via GHSR-1 α /AMPK/Sirt1/PGC-1 α /UCP2 pathway in a rat model of neonatal HIE. *Free Radic Biol Med* 2019; **141**:322–337.
- Kim JE, Kim YW, Lee IK, Kim JY, Kang YJ, Park SY. AMP-activated protein kinase activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) inhibits palmitate-induced endothelial cell apoptosis through reactive oxygen species suppression. *J Pharmacol Sci* 2008; **106**:394–403.
- Kitagawa K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. *FEBS J* 2007; **274**:3210–3217.
- Modak M, Dixit P, Londhe J, Ghaskadbi S, Devasagayam TP. Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. *J Clin Biochem Nutr* 2007; **40**:163–173.
- Gu Z, Chu L, Han Y. Therapeutic effect of resveratrol on mice with depression. *Exp Ther Med* 2019; **17**:3061–3064.
- Li B-S, Kramer PR, Zhao W, Ma W, Stenger DA, Zhang L. Molecular cloning, expression, and characterization of rat homolog of human AP-2 α that stimulates neuropeptide Y transcription activity in response to nerve growth factor. *Molec Endocrinol* 2000; **14**:837–847.
- Ko SY, Ko HA, Chu KH, Shieh TM, Chi TC, Chen HI, et al. The possible mechanism of advanced Glycation End Products (AGEs) for Alzheimer's Disease. *PLoS One* 2015; **10**:e0143345.
- Cheng PW, Ho WY, Su YT, Lu PJ, Chen BZ, Cheng WH, et al. Resveratrol decreases fructose-induced oxidative stress, mediated by NADPH oxidase via an AMPK-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 2014; **171**:2739–2750.

CAPÍTULO II
Efecto ex vivo del resveratrol sobre el estrés oxidativo y la
AMPK hipotalámica en ratas Wistar con hiperglucemia

Introducción

La homeóstasis energética es regulada por una red de señales entre el sistema nervioso central (SNC) y órganos periféricos (Valassi et al., 2008). En esta red de señales participa el hipotálamo que recibe señales periféricas del estómago, páncreas y el tejido adiposo, de tal manera que induzcan (señales orexigénicas) o inhiban el apetito (señales anorexigénicas). (Roh and Kim, 2016).

La grelina, se encarga de activar las señales oxigénicas, en tanto que la leptina e insulina, tienen un efecto anorexigénico (Thon et al., 2016; van Swieten et al., 2014). Siendo la vía que regula a la cinasa de AMP (AMPK) (Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004). la principal vía que induce un aumento o disminución de la expresión de las moléculas que regulan las señales de saciedad (POMC y CART) (Varela and Horvath, 2012) y apetito (AgRP y NPY) (Varela and Horvath, 2012). Se ha reportado que en la diabetes mellitus existe un descontrol en la homeostasis energética, derivado de altos niveles de glucosa sanguínea y al aumento en la producción de EROs, esto último superando a las defensas antioxidantes endógenas, conduciendo a la célula a un estado de estrés oxidativo (Valko et al., 2007). Se ha reportado que las EROs en el hipotálamo regulan las respuestas anorexigénicas y orexigénicas de diferentes maneras (Drougard et al., 2015). Por una lado, la insulina en el hipotálamo aumenta la producción de EROs, por activación de las NADPH oxidasas y esto a su vez aumenta la activación de las vías que son reguladas por la insulina, como la vía PI3K/Akt (Onoue et al., 2016); así como el incremento en la fosforilación de STAT3 (Diano et al., 2011) regulando los mecanismos mediados por la insulina anteriormente mencionados (Onoue et al., 2016)(26). Por el contrario, cuando existe disminución de las EROs, se reduce la expresión de *POMC* (Diano et al., 2011) y aumenta la expresión de *Npy* y *AgRP* (Andrews et al., 2008)., aunque se desconoce los mecanismos moleculares que llevan a la regulación de estos neuropeptidos. Debido a que el estrés oxidante afecta vías de señalización en hipotálamo, se plantea la utilización de antioxidantes exógenos con la finalidad de disminuir el estrés oxidativo y restablecer dichas señales (Modak et al., 2007).

El Resveratrol (RSV), es una fitoalexina natural encontrada principalmente en las uvas y un potente antioxidante (Keylor et al., 2015). Ko *et al.*, en el 2015, reportó que el

RSV a una concentración de 20 μM , es capaz de reducir a las EROS y a los productos finales de la glicosilación avanzada generados en la línea celular neuronal SH-SY5Y. El RSV también tiene efecto sobre la fosforilación de la AMPK, ya que en la línea celular 3T3-L1 las concentraciones de 25, 50 y 100 μM de RSV aumentan la fosforilación de la AMPK, dependiente de la concentración (Chen et al., 2015). La activación de la AMPK por RSV está involucrada en la disminución de la producción de las EROs mediante la inhibición de la NADHP oxidasa, en tejido cerebral de ratas con estrés oxidante inducido con fructosa y tratadas con 100 mg/kg de RSV (Cheng et al., 2014); esta misma dosis de RSV induce saciedad en ratones C57BL/6, a las 48 h después de la inyección por vía intraperitoneal, este efecto es debido a que el RSV disminuye la expresión de los neuropéptidos Npy y AgRP por lo que este antioxidante puede tener efecto en la regulación de las señales orexigénicas y anorexigénicas en el hipotálamo que regulan la conducta alimentaria (Kim et al., 2010).

Debido a que es poco estudiado sobre el estrés oxidante y su relación con la vía de señalización de la AMPK en hipotálamo, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto del RSV sobre la fosforilación de la AMPK hipotalámica y sobre proteínas río arriba y abajo de su regulación, en tejido hipotalámico con hiperglucemia.

Material y métodos

Modelo animal

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de entre 250-300 g de peso y 8 semanas de edad, que fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Para generar la hiperglucemia se inyectó una dosis única (60 mg/kg) de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por vía intraperitoneal. Después de 48 h de la inducción con STZ se midieron los niveles de glucosa sanguínea utilizando tiras reactivas y el glucómetro OneTouch® (LifeScan, Pensilvania EUA). Las ratas serán consideradas con hiperglucemia cuando presenten valores de glucosa sanguínea mayores a 250 mg/dL. Las ratas se mantuvieron durante 28 días con hiperglucemia. Al término de cada uno de los tiempos se realizó el sacrificio de los animales para obtener el tejido hipotalámico.

Obtención del tejido hipotálamo y ensayo ex vivo

Al término de los 28 días con hiperglucemia cada grupo de animales fueron sedados con pentobarbital sódico (120 mg/kg i.p. NOM-062-ZOO-1999) y se realizó la decapitación para obtener el tejido hipotalámico. Se empleó el aparato McIlwain Tissue Chopper para obtener cortes del hipotálamo de 300 μ m. Posteriormente, los cortes se mantuvieron a 37 °C en medio Krebs Heinsleit oxigenado (124 mM NaCl, 0.76 mM KCl, 1.24 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM Glucosa, 26 mM Tris-HCl pH 7.4). Para el tratamiento con RSV se realizó una curva de dosis, utilizando 100 y 200 μ M, diluido en DMSO (<1%). El estímulo con los tratamientos fue por 120 min, con una adaptación previa de 60 min, ambos a 37 °C. Al término de la estimulación el tejido hipotalámico se separó en dos tubos, se homogeneizó en buffer de fosfatos 0.067 M pH 7.0, para la determinación del estrés oxidativo y otro en buffer de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% desoxicolato de sodio, 5 mM EDTA y 50 mM HEPES, pH 7.5), suplementado con pirofosfato de sodio, inhibidores de proteasas y fosfatasa, para la extracción de las proteínas totales.

Niveles de malondialdehído

El tejido hipotalámico homogenizado en buffer de 0.067 M pH 7.0 se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se utilizó el sobrenadante para medir los niveles de MDA. Los niveles de MDA en el hipotálamo se determinaron con el reactivo 1-metil-2-fenilindole (MPI). Se utilizaron 200 μ l del sobrenadante previamente obtenido y se le adicionaron 650 μ l de MPI (10 mM) y 150 μ l de HCl al 37%. La mezcla se incubó por 40 min a 45 °C. El tubo se centrifugó a 7000 rpm por 10 min. Se utilizó el sobrenadante para medir el nivel de MDA por espectrofotometría en el Nanodrop 2000c a 586 nm. Se utilizó como estándar 1, 1, 3,3-tetrametoxipropano (Malondialdehído bis (dimetilacetal)) (Sigma. S. Louis, MO, USA). Los resultados se ajustaron con la concentración total de proteína.

Cuantificación de la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Se tomaron 50 μ l del sobrenadante en buffer de 0.067 M pH 7.0, y se mezclaron con 800 μ L de solución redox (buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, azida de

sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, glutatión reductasa y 1 U/ml y glutatión reducido 1 mM) y se incubó durante 5 min a 37°C. Al término de la incubación se agregaron 100 µL de H₂O₂ 0.25 mM mezclando por inversión. Se realizaron 3 lecturas (1 cada minuto durante 3 minutos) por espectrofotometría en el Nanodrop 2000c a 340 nm. Los cambios de absorbancia fueron promediados y el coeficiente de absorción milimolar del NADPH a 340 nm (6.22x10⁶) fue empleado para cuantificar la actividad. Los resultados se ajustaron por mg de proteína.

Extracción de proteínas y western blot

La concentración de proteína total se determinó por el método de Bradford. Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% con 20 µg de proteína total diluida en buffer de muestra (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0.01% azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de conejo para p-AMPKα 1/2 (Thr172) (Cell Signalling), anticuerpo policlonal de conejo para AMPK (Santa Cruz), anticuerpo monoclonal de conejo para el receptor de insulina subunidad β (Cell Signalling), anticuerpo monoclonal de conejo para neuropeptido Y (Cell Signalling), anticuerpo policlonal de conejo para GHS-R1a, anticuerpo monoclonal de conejo para GAPDH (Cell Signalling) y anticuerpo policlonal anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch). Los inmunocomplejos fueron detectados utilizando Immobilon y con el sistema de imagen ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Resultados

Efecto del RSV *ex vivo* sobre los niveles de MDA en hipotálamo de ratas con hiperglucemia

Para determinar el efecto del RSV (100 y 200 µM) *ex vivo*, sobre el nivel de MDA, se evaluó el nivel del MDA en hipotálamo de ratas Wistar con 28 días de hiperglucemia.

Encontramos que el tejido con HG aumentó 44% en comparación con el grupo C. Con el tratamiento con RSV, el nivel de MDA disminuyó 120% y 124%, para 100 y 200 μM , respectivamente, en comparación con el grupo HG (Figura 1).

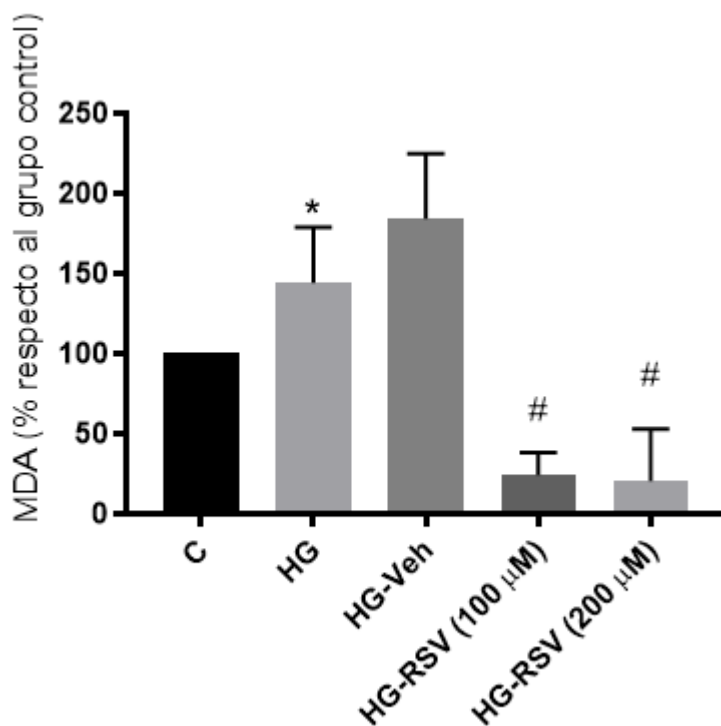


Figura 1. Efecto del RSV sobre el nivel de MDA en hipotálamo de ratas Wistar con hiperglucemia. Para determinar el efecto del RSV (50, 100 y 200 μM), *ex vivo*, sobre el daño por EROs a lípidos, se determinó el nivel de MDA en hipotálamo de ratas Wistar. Datos mostrados en porcentaje respecto al control (media +/- desviación estandar), * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. HG.

Efecto del RSV ex vivo sobre la actividad de la Gpx en hipotálamo de ratas con hiperglucemia

Para evaluar el efecto del RSV (100 y 200 μM) sobre la actividad de la Gpx en hipotálamo de ratas Wistar, se determinó por espectrofotometría la actividad de esta enzima en tejido hipotalámico de ratas Wistar con hiperglucemia.

En el grupo con HG, la actividad de Gpx disminuyó 33% en comparación con el grupo C. Por otro lado, encontramos que después del tratamiento con las diferentes concentraciones de RSV, la actividad de la Gpx aumentó 18% con la dosis de 100 μM ,

mientras que con 200 μM la actividad de la Gpx disminuyó 57%, en comparación con el grupo HG (Figura 2).

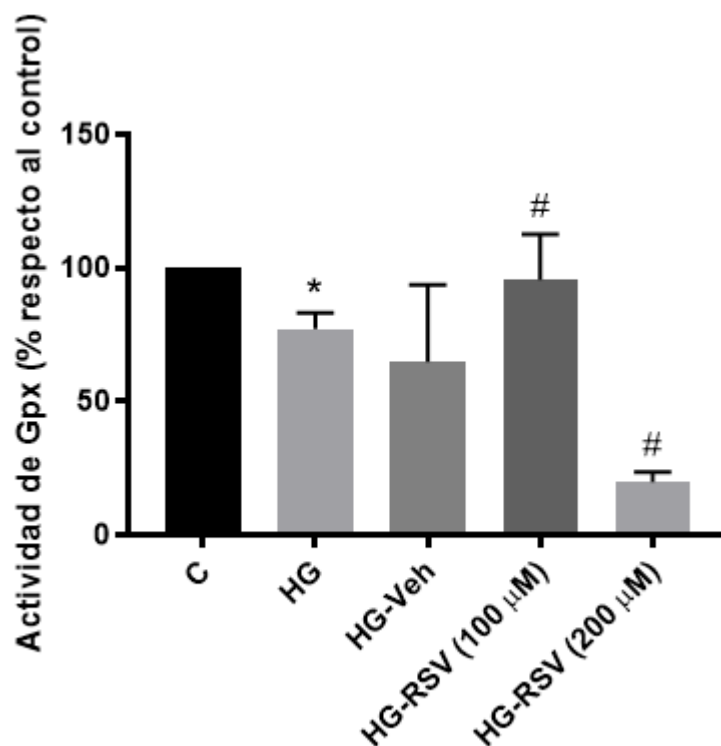


Figura 2. Efecto del RSV sobre la actividad de Gpx en hipotálamo de ratas Wistar con hiperglucemia. Para determinar el efecto del RSV (50, 100 y 200 μM), *ex vivo*, sobre la actividad de la Gpx, se determinó su actividad en hipotálamo de ratas Wistar. C: Control; HG: Hiperglucemia; HG-Veh: Vehículo; HG-RSV (100 μM): Hiperglucemia con 100 μM de RSV; HG-RSV (200 μM): Hiperglucemia con 200 μM de RSV. Datos mostrados en porcentaje respecto al control (media \pm desviación estándar), * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. HG.

Efecto del RSV *ex vivo* sobre los niveles proteicos de los receptores GHS-R1 y RI β en hipotálamo de ratas con hiperglucemia

Se evaluó el efecto del RSV sobre los niveles proteicos de los receptores, un receptor orexigénico, GHS-R1a y un receptor anorexigénico RI β . Para lo anterior se realizó Western blot de proteínas extraídas de tejido hipotalámico estimulado con RSV. Se encontró, que el receptor GHS-R1a, aumenta su expresión 32% en el grupo HG en comparación con el grupo C y que el tratamiento *ex vivo* con RSV 100 y 200 μM disminuye la expresión 40 y 80%, respectivamente comparación al grupo HG (Figura 3 a, b).

Por otro lado, para el RI β , se observó que en el grupo HG aumentó la expresión del receptor y que la dosis de 200 μM de RSV tiende a disminuir en comparación con el grupo HG (Figura 3 a, c).

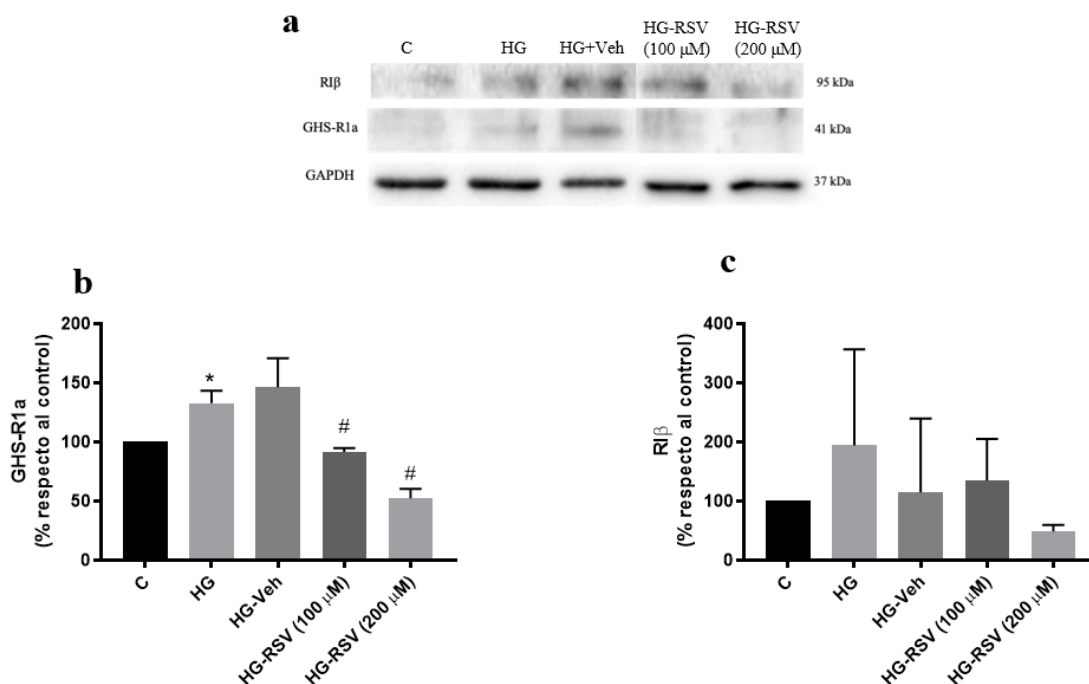


Figura 3. Efecto del RSV sobre los niveles proteicos de los receptores GHS-R1 y IR β en hipotálamo de ratas con hiperglucemia. Para determinar el efecto ex vivo del RSV sobre los niveles proteicos de los receptores GHS-R1 y IR β se realizó el Western blot, el control de carga se realizó mediante la detección de GAPDH. a) Western blot del efecto ex vivo del RSV sobre niveles proteicos de GHS-R1 y IR β en hipotálamo de ratas con hiperglucemia b) Comparación de los niveles proteicos de GHS-R1 y c) IR β en hipotálamo de ratas con hiperglucemia. C: Control; HG: Hiperglucemia; HG-Veh: Vehículo; HG-RSV (100 μM): Hiperglucemia con 100 μM de RSV; HG-RSV (200 μM): Hiperglucemia con 200 μM de RSV. Datos mostrados en porcentaje respecto al control (media \pm desviación estándar), * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. HG.

Efecto del RSV ex vivo sobre la fosforilación de la AMPK hipotalámica de ratas con hiperglucemia

Para determinar el efecto ex vivo del RSV sobre la fosforilación de la AMPK hipotalámica en ratas con hiperglucemia, se evaluó la expresión de la AMPK total y fosforilada en tejido hipotalámico de ratas Wistar con hiperglucemia. Se observó que la fosforilación de la AMPK aumenta 50% en el grupo HG en comparación con el grupo C, y que esta fosforilación disminuyó 41% con la dosis de 100 μM de RSV. Por otra parte, en la dosis de 200 μM , la fosforilación aumenta 61% en comparación con el grupo HG (Figura 4).

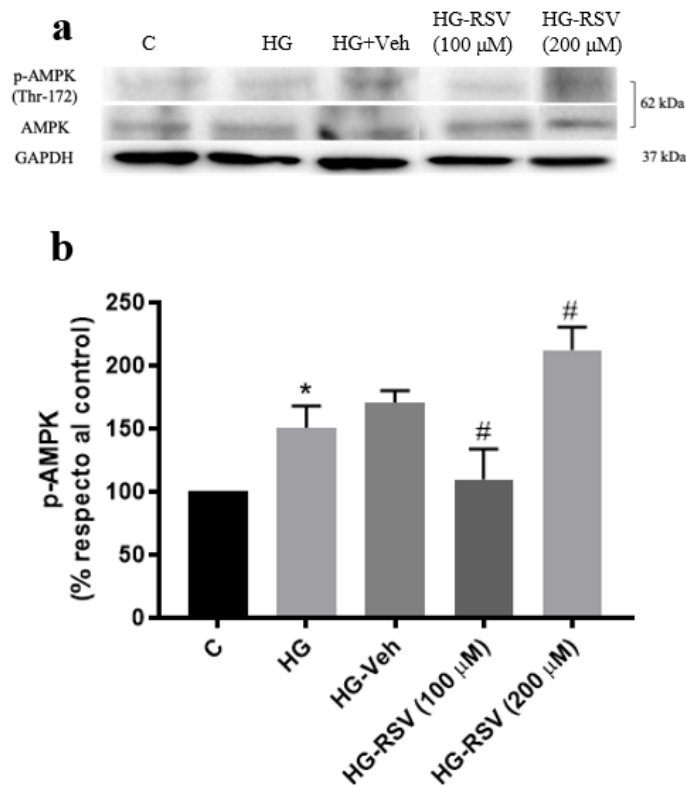


Figura 4. Efecto del RSV sobre la fosforilación de AMPK hipotalámica de ratas con hiperglucemia. Para determinar el efecto *ex vivo* del RSV sobre la fosforilación de AMPK hipotalámica se realizó el Western blot para la detección de pThr-172 de la AMPK, el control de carga se realizó mediante la detección de AMPK total. A) Comparación del nivel de fosforilación de AMPK hipotalámica de ratas con hiperglucemia. B) Western blot del efecto *ex vivo* del RSV sobre la fosforilación de la AMPK. C: Control; HG: Hiperglucemia; HG-Veh: Vehículo; HG-RSV (100 μM): Hiperglucemia con 100 μm de RSV; HG-RSV (200 μM): Hiperglucemia con 200 μm de RSV. Datos mostrados en porcentaje respecto al control (media +/- desviación estándar), * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. HG.

Efecto del RSV *ex vivo* sobre el nivel proteico de NPY en hipotálamo de ratas con hiperglucemia

Se evaluó el efecto del RSV sobre la expresión de NPY, esto se determinó por medio de Western blot utilizando proteínas extraídas de tejido hipotalámico de ratas Wistar con hiperglucemia, encontrando que en el grupo HG la expresión aumentó 112% en comparación con el grupo C. El tratamiento *ex vivo* con RSV no provocó cambios en la expresión del este neuropéptido orexigénico.

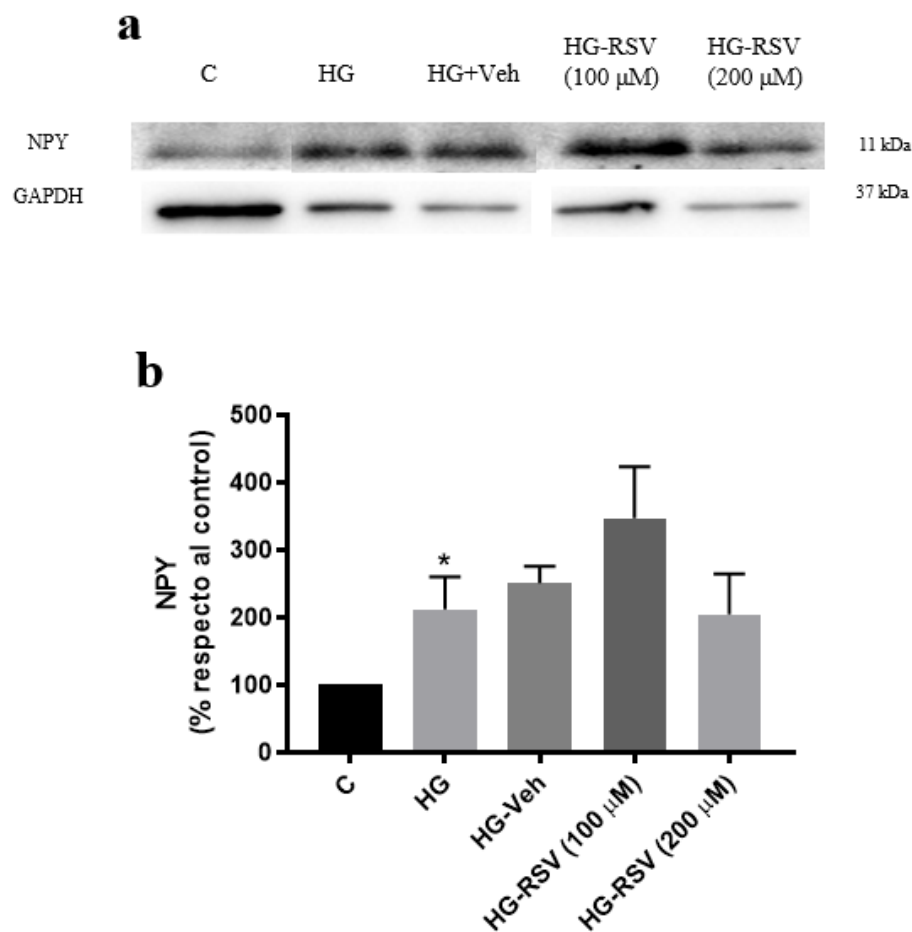


Figura 5. Efecto del RSV sobre el nivel proteico del NPY en hipotálamo de ratas con hiperglucemia. Para determinar el efecto ex vivo del RSV sobre el nivel proteico del NPY en el hipotálamo se realizó el Western blot, el control de carga se realizó mediante la detección de GAPDH total. a) Western blot del efecto ex vivo del RSV sobre el nivel proteico de NPY en el hipotálamo de ratas con hiperglucemia. b) Comparación del nivel proteico de NPY en hipotálamo de ratas con hiperglucemia. C: Control; HG: Hiperglucemia; HG-Veh: Vehículo; HG-RSV (100 μ M): Hiperglucemia con 100 μ M de RSV; HG-RSV (200 μ M): Hiperglucemia con 200 μ M de RSV. Datos mostrados en porcentaje respecto al control (media \pm desviación estándar), * $p < 0.05$ vs. C.

Discusión

En resultados previos (Mendoza-Bello et al, 2021), encontramos que el estrés oxidativo regula la fosforilación de la AMPK así como también la expresión de ciertas moléculas río arriba y abajo. Por esta razón se utilizó un tratamiento antioxidante (RSV) para poder observar si realmente el EO está directamente relacionado con la regulación de dichas moléculas.

El tratamiento con RSV consistió en dos diferentes dosis, 100 y 200 μ M, que permitieron evaluar su efectividad sobre los cambios en los niveles de MDA. Se

encontró que los niveles de MDA aumentan en el grupo HG en comparación con el grupo control, después de 28 días de HG. Al tratar el tejido hipotalámico con el RSV, se observó una disminución en el nivel de este marcador de daño a lípidos. De manera similar, Sadi and Konat, en el 2015, previamente observaron que el RSV disminuye los niveles de MDA en cerebro de ratas diabéticas, así también en cultivos de eritrocitos sujetos a estrés oxidativo (Pandey and Rizvi, 2009). El efecto protector del RSV, es debido a su capacidad para neutralizar las EROs y siendo eficaz para inhibir la peroxidación lipídica de las membranas (Leonard *et al.*, 2003). Esta capacidad antioxidante está asociada a su estructura con grupos OH que son capaces de atraer a los radicales libres y neutralizarlos (Leonard *et al.*, 2003).

También se analizó la actividad de la enzima Glutación peroxidasa y encontramos que en el grupo HG la actividad de la GPx disminuye, comportamiento similar a nuestros resultados previos (Mendoza-Bello, *et al.*, 2021). Al evaluar el efecto del RSV sobre la actividad de esta enzima, observamos un aumento en su actividad con la dosis de 100 μM , pero una disminución con la dosis de 200 μM . El efecto de un antioxidante exógeno es dependiente de la dosis: algunas moléculas son reguladas de acuerdo a la concentración del RSV que se le administre al sistema de estudio (Sadi and Konat, 2015). Para el caso de 200 μM , en donde encontramos que el RSV disminuye la actividad de la Gpx, puede deberse a que en concentraciones altas el RSV es capaz de neutralizar completamente a las EROs (Song *et al.*, 2018), evitando que estas moléculas cumplan su función de regular la expresión de las enzimas antioxidantes endógenas (J. Zhang *et al.*, 2016). Con esto podríamos concluir que el RSV regula el estrés oxidativo, mediante la disminución del nivel de MDA y la regulación de la actividad de la Gpx, en forma dependiente de la dosis.

Después de observar el efecto del RSV sobre el estrés oxidativo, analizamos por medio de WB la expresión de los receptores a grelina e insulina, importantes reguladores de la ingesta de alimentos en el hipotálamo (Kohno *et al.*, 2008; Thon *et al.*, 2016). Al analizar la expresión de GHS-R1a, observamos que su expresión aumenta en condiciones de hiperglucemia, mientras que el tratamiento con RSV disminuye la expresión de este receptor.

Considerando que el GHS-R1a regula positivamente el apetito, encontrar su expresión elevada en condiciones de HG nos sugiere un mecanismo por el cual en condiciones diabéticas la hiperfagia se mantiene. Esta regulación positiva en la expresión puede estar acorde al estado de alimentación en el que se encuentre el animal, ya que en estados de ayuno prolongado aumenta la expresión de este receptor (Kim et al., 2003). Aunque se conoce que en condiciones de DM se mantiene la hiperfagia y esto se podría traducir a que no existe ayuno, a nivel celular no hay entrada de glucosa, debido a la resistencia a la insulina o niveles reducidos de esta hormona que puedan regular correctamente la captación de glucosa (Alwahsh et al., 2017). Asimismo, el funcionamiento correcto de neuronas que censan los niveles de glucosa y regulan la señales a nivel del núcleo arcuato, principal núcleo que regula la ingesta de alimentos en el hipotálamo podría estar afectado y por lo tanto llevando al aumento de la captación de glucosa a nivel del hipotálamo (Wang et al., 2004). Para el caso del receptor de insulina, encontramos una expresión variada en cada uno de los grupos, hay que considerar que la expresión del RI en el cerebro es poco estudiada, aunque en otros tejidos el estrés oxidativo la puede regular tanto positiva y como negativamente (Gual et al., 2005; Hayes and Lockwood, 1987).

Después de observar el aumento en la fosforilación de la AMPK en condiciones de hiperglucemia, se trató el tejido con RSV, encontrando que en dosis de 100 μ M la fosforilación de la AMPK disminuye. Este efecto puede ser debido a la capacidad antioxidante del RSV, ya que se ha reportado que en condiciones de estrés oxidativo aumenta los niveles de calcio intracelular teniendo efecto sobre la activación de la CaMKK2 y este a su vez disminuyendo la fosforilización de la AMPK (Anderson et al., 2008). Por otra parte, observamos que la dosis de 200 μ M aumenta la fosforilación de la AMPK. Este mecanismo puede ser debido que al RSV aparte de su capacidad antioxidante, se le ha atribuido otras funciones, como la de regular proteínas como las sirtuinas (SIRT) (Tian et al., 2016). SIRT1 regula la fosforilación de la AMPK (Kulkarni and Cantó, 2015), y esto puede ser dependiente de la dosis de RSV que se administró al sistema de estudio. Por último, se analizó la expresión del neuropéptido Y, un neuropéptido orexigénico, encontrando que en condiciones de HG aumenta su expresión, y esto puede ser debido a la misma condición de EO que mantiene activada

la vía de la AMPK tendiendo como consecuencia el aumento en la expresión de dicho neuropéptido (Namkoong et al., 2005). Al tratar el tejido con RSV observamos que no hay cambios en la expresión del NPY, se esperaba que la expresión de NPY disminuyera en relación con la disminución de la fosforilación de la AMPK. Se ha reportado que algunos antioxidantes exógenos y endógenos regulan la expresión, positiva y negativa, de neuropéptidos y que este podría ser el mecanismo que explique porque en dosis de 100 y 200 μM no observamos la disminución esperada (Kuo et al., 2015). Por lo tanto, se puede concluir que el efecto del RSV es dependiente de sus dosis administrada.

Referencias

- Al Qarni, A.A., Joatar, F.E., Das, N., Awad, M., Eltayeb, M., Al-Zubair, A.G., Ali, M.E., Al Masaud, A., Shire, A.M., Gumaa, K., Giha, H.A., 2017. Association of Plasma Ghrelin Levels with Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus among Saudi Subjects. *Endocrinol. Metab.* 32, 230–240. <https://doi.org/10.3803/EnM.2017.32.2.230>
- Alwahsh, S.M., Dwyer, B.J., Forbes, S., van Thiel, D.H., Starkey Lewis, P.J., Ramadori, G., 2017. Insulin Production and Resistance in Different Models of Diet-Induced Obesity and Metabolic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18020285>
- Anamthathmakula, P., Sahu, M., Sahu, A., 2015. Evidence suggesting phosphodiesterase-3B regulation of NPY/AgRP gene expression in mHypoE-46 hypothalamic neurons. *Neurosci. Lett.* 604, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.003>
- Anderson, K.A., Ribar, T.J., Lin, F., Noeldner, P.K., Green, M.F., Muehlbauer, M.J., Witters, L.A., Kemp, B.E., Means, A.R., 2008. Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab.* 7, 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.02.011>
- Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C.R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S.R., Carling, D., Small, C.J., 2004. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J. Biol. Chem.* 279, 12005–12008. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300557200>
- 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., Diano, S., 2008. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454, 846–851. <https://doi.org/10.1038/nature07181>
- Bailey, L.E., Ong, S.D., 1978. Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. *J. Pharmacol. Methods* 1, 171–175. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(78\)90022-0](https://doi.org/10.1016/0160-5402(78)90022-0)
- Chen, S., Zhou, N., Zhang, Z., Li, W., Zhu, W., 2015. Resveratrol induces cell apoptosis in adipocytes via AMPK activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 608–613. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.034>

- Cheng, P.-W., Ho, W.-Y., Su, Y.-T., Lu, P.-J., Chen, B.-Z., Cheng, W.-H., Lu, W.-H., Sun, G.-C., Yeh, T.-C., Hsiao, M., Tseng, C.-J., 2014. Resveratrol decreases fructose-induced oxidative stress, mediated by NADPH oxidase via an AMPK-dependent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2739–2750. <https://doi.org/10.1111/bph.12648>
- Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., Kahn, B.B., 2012. p70S6 Kinase Phosphorylates AMPK on Serine 491 to Mediate Leptin's Effect on Food Intake. *Cell Metab.* 16, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.010>
- Diano, S., Liu, Z.-W., Jeong, J.K., Dietrich, M.O., Ruan, H.-B., Kim, E., Suyama, S., Kelly, K., Gyengesi, E., Arbiser, J.L., Belsham, D.D., Sarruf, D.A., Schwartz, M.W., Bennett, A.M., Shanabrough, M., Mobbs, C.V., Yang, X., Gao, X.-B., Horvath, T.L., 2011. Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat. Med.* 17, 1121–1127. <https://doi.org/10.1038/nm.2421>
- Dickson, E.J., Falkenburger, B.H., Hille, B., 2013. Quantitative properties and receptor reserve of the IP3 and calcium branch of Gq-coupled receptor signaling. *J. Gen. Physiol.* 141, 521–535. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210886>
- Dong, J., Peeters, T.L., De Smet, B., Moechars, D., Delpoortere, C., Vanden Berghe, P., Coulie, B., Tang, M., Depoortere, I., 2006. Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology* 147, 2634–2642. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1335>
- Drougard, A., Fournel, A., Valet, P., Knauf, C., 2015. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00056>
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2002. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocr. Rev.* 23, 599–622. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0039>
- Fisslthaler, B., Fleming, I., 2009. Activation and Signaling by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells. *Circ. Res.* 105, 114–127. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.201590>
- Gamber, K.M., Huo, L., Ha, S., Hairston, J.E., Greeley, S., Bjørnbæk, C., 2012. Over-Expression of Leptin Receptors in Hypothalamic POMC Neurons Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity. *PLOS ONE* 7, e30485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030485>
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C., Chaudière, J., 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1176–1183. <https://doi.org/10.1021/tx9701790>
- González-Garrido, J.A., García-Sánchez, J.R., Garrido-Llanos, S., Olivares-Corichi, I.M., 2017. An association of cocoa consumption with improved physical fitness and decreased muscle damage and oxidative stress in athletes. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 57, 441–447. <https://doi.org/10.23736/S0022-4707.16.06032-1>
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.-F., 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.10.019>

- Gwarzo, M.Y., Ahmadu, J.H., Ahmad, M.B., Dikko, A.U.A., 2014. Serum Glucose and Malondialdehyde Levels in Alloxan Induced Diabetic Rats Supplemented with Methanolic Extract of *Tacazzea Apiculata*. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* 10, 236–242.
- Gyengesi, E., Paxinos, G., Andrews, Z.B., 2012. Oxidative Stress in the Hypothalamus: the Importance of Calcium Signaling and Mitochondrial ROS in Body Weight Regulation. *Curr. Neuropharmacol.* 10, 344–353. <https://doi.org/10.2174/157015912804143496>
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., Schwartz, M.W., 1998. Coexpression of *AgRP* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 271–272. <https://doi.org/10.1038/1082>
- Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A., 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- Havel, P.J., Hahn, T.M., Sindelar, D.K., Baskin, D.G., Dallman, M.F., Weigle, D.S., Schwartz, M.W., 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.
- Hayes, G.R., Lockwood, D.H., 1987. Role of insulin receptor phosphorylation in the insulinomimetic effects of hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8115–8119.
- Huynh, M.K.Q., Kinyua, A.W., Yang, D.J., Kim, K.W., 2016. Hypothalamic AMPK as a Regulator of Energy Homeostasis. *Neural Plast.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2754078>
- Ishii, S., Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Sugihara, H., Oikawa, S., 2002. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. *Endocrinology* 143, 4934–4937. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220612>
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D.G., 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.003>
- Kamata, H., Hirata, H., 1999. Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cell. Signal.* 11, 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(98\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(98)00037-0)
- Keylor, M.H., Matsuura, B.S., Stephenson, C.R.J., 2015. Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products. *Chem. Rev.* 115, 8976–9027. <https://doi.org/10.1021/cr500689b>
- Kim, M.-S., Yoon, C.-Y., Park, K.-H., Shin, C.-S., Park, K.-S., Kim, S.-Y., Cho, B.-Y., Lee, H.-K., 2003. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *NeuroReport* 14, 1317–1320. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000078703.79393.d2>
- Kim, S.-J., Lee, Y.H., Han, M.-D., Mar, W., Kim, W.-K., Nam, K.-W., 2010. Resveratrol, purified from the stem of *Vitis coignetiae* Pulliat, inhibits food intake in C57BL/6J Mice. *Arch. Pharm. Res.* 33, 775–780. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0518-5>
- Ko, S.-Y., Ko, H.-A., Chu, K.-H., Shieh, T.-M., Chi, T.-C., Chen, H.-I., Chang, W.-C., Chang, S.-S., 2015. The Possible Mechanism of Advanced Glycation End Products (AGEs) for Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143345>
- Kohno, D., Sone, H., Minokoshi, Y., Yada, T., 2008. Ghrelin raises $[Ca^{2+}]_i$ via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus *NPY* neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 388–392. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.166>

- Kulkarni, S.S., Cantó, C., 2015. The molecular targets of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1852, 1114–1123. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.005>
- Kuo, D.-Y., Chen, P.-N., Hsieh, Y.-S., 2015. Targeting oxidative stress in the hypothalamus: the effect of transcription factor STAT3 knockdown on endogenous antioxidants-mediated appetite control. *Arch. Toxicol.* 89, 87–100. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1252-4>
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B., 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3, 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
- Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.-H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shi, X., 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 1017–1026.
- Lim, C.T., Kola, B., Korbonits, M., 2010. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 87–97. <https://doi.org/10.1677/JME-09-0063>
- Ma, W., Fuentes, G., Shi, X., Verma, C., Radda, G.K., Han, W., 2015. FoxO1 negatively regulates leptin-induced POMC transcription through its direct interaction with STAT3. *Biochem. J.* 466, 291–298. <https://doi.org/10.1042/BJ20141109>
- Ma, X., Zubcevic, L., Ashcroft, F.M., 2008. Glucose regulates the effects of leptin on hypothalamic POMC neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9811–9816. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800952105>
- Maiese, K., 2015. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 875961. <https://doi.org/10.1155/2015/875961>
- Maniscalco, J.W., Rinaman, L., 2014. Systemic leptin dose-dependently increases STAT3 phosphorylation within hypothalamic and hindbrain nuclei. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, R576-585. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00017.2014>
- Minasian, S.M., Galagudza, M.M., Dmitriev, Y.V., Kurapeev, D.I., Vlasov, T.D., 2013. Myocardial protection against global ischemia with Krebs-Henseleit buffer-based cardioplegic solution. *J. Cardiothorac. Surg.* 8, 60. <https://doi.org/10.1186/1749-8090-8-60>
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fougelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J., Kahn, B.B., 2004. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569–574. <https://doi.org/10.1038/nature02440>
- Modak, M., Dixit, P., Londhe, J., Ghaskadbi, S., Paul A. Devasagayam, T., 2007. Indian Herbs and Herbal Drugs Used for the Treatment of Diabetes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 40, 163–173. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.40.163>
- Namkoong, C., Kim, M.S., Jang, P.G., Han, S.M., Park, H.S., Koh, E.H., Lee, W.J., Kim, J.Y., Park, I.S., Park, J.Y., Lee, K.U., 2005. Enhanced Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase Activity Contributes to Hyperphagia in Diabetic Rats. *Diabetes* 54, 63–68. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.63>
- Oh, T.S., Cho, H., Cho, J.H., Yu, S.-W., Kim, E.-K., 2016. Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy* 12, 2009–2025. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1215382>

- 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. *Neurosci. Lett.* 619, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.03.011>
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34, 1093–1097. <https://doi.org/10.1139/H09-115>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Raney, M.A., Turcotte, L.P., 2008. Evidence for the involvement of CaMKII and AMPK in Ca²⁺-dependent signaling pathways regulating FA uptake and oxidation in contracting rodent muscle. *J. Appl. Physiol.* 104, 1366–1373. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01282.2007>
- Ren, H., Orozco, I.J., Su, Y., Suyama, S., Gutiérrez-Juárez, R., Horvath, T.L., Wardlaw, S.L., Plum, L., Arancio, O., Accili, D., 2012. G protein-coupled purinergic receptor GPR17 mediates orexigenic effects of FoxO1 in AgRP neurons. *Cell* 149, 1314–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.032>
- Roh, E., Kim, M.-S., 2016. Brain Regulation of Energy Metabolism. *Endocrinol. Metab.* 31, 519–524. <https://doi.org/10.3803/EnM.2016.31.4.519>
- Sadi, G., Konat, D., 2015. Resveratrol regulates oxidative biomarkers and antioxidant enzymes in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm. Biol.* 1–8. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1056311>
- Song, J., Huang, Y., Zheng, W., Yan, J., Cheng, M., Zhao, R., Chen, L., Hu, C., Jia, W., 2018. Resveratrol reduces intracellular reactive oxygen species levels by inducing autophagy through the AMPK-mTOR pathway. *Front. Med.* <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0655-7>
- Styskal, J., Van Remmen, H., Richardson, A., Salmon, A.B., 2012. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic. Biol. Med.* 52, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.441>
- Thomson, D.M., Herway, S.T., Fillmore, N., Kim, H., Brown, J.D., Barrow, J.R., Winder, W.W., 2008. AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 104, 429–438. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00900.2007>
- Thon, M., Hosoi, T., Ozawa, K., 2016. Possible Integrative Actions of Leptin and Insulin Signaling in the Hypothalamus Targeting Energy Homeostasis. *Front. Endocrinol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00138>
- Tian, Y., Ma, J., Wang, W., Zhang, L., Xu, J., Wang, K., Li, D., 2016. Resveratrol supplement inhibited the NF- κ B inflammation pathway through activating AMPK α -SIRT1 pathway in mice with fatty liver. *Mol. Cell. Biochem.* 422, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2807-x>

- Valassi, E., Scacchi, M., Cavagnini, F., 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 18, 158–168.
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.06.004>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- van Swieten, M.M.H., Pandit, R., Adan, R.A.H., van der Plasse, G., 2014. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* 61–62, 207–220.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.05.004>
- Varela, L., Horvath, T.L., 2012. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* 13, 1079–1086.
<https://doi.org/10.1038/embor.2012.174>
- Wang, R., Liu, X., Hentges, S.T., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E., Wang, W., Routh, V.H., 2004. The Regulation of Glucose-Excited Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus by Glucose and Feeding-Relevant Peptides. *Diabetes* 53, 1959–1965.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.53.8.1959>
- Yang, C.S., Lam, C.K.L., Chari, M., Cheung, G.W.C., Kokorovic, A., Gao, S., Leclerc, I., Rutter, G.A., Lam, T.K.T., 2010. Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase Regulates Glucose Production. *Diabetes* 59, 2435–2443. <https://doi.org/10.2337/db10-0221>
- Yasrebi, A., Hsieh, A., Mamounis, K.J., Krumm, E.A., Yang, J.A., Magby, J., Hu, P., Roepke, T.A., 2016. Differential gene regulation of GHSR signaling pathway in the arcuate nucleus and NPY neurons by fasting, diet-induced obesity, and 17 β -estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* 422, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.11.007>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W., 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–18.
<https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, Q., Yang, C., Zhang, S., Zhang, L., Li, J., 2016. Alteration of NPY in hypothalamus and its correlation with leptin and ghrelin during the development of T2DM in a rat model. *SpringerPlus* 5, 1913. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3555-9>
- Zündorf, G., Reiser, G., 2011. Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1275–1288.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3359>

Discusión

En el presente trabajo se observó que la hiperglucemia durante 7, 14 y 28 días, aumenta la ingesta diaria de alimento en las ratas Wistar. Estos resultados pueden explicar que existe una desregulación tanto de hormonas que regulan el apetito como las vías de señalización en el hipotálamo, órgano que se encarga de regular las señales de apetito y saciedad. Se ha demostrado que durante la hiperglucemia existe un aumento en las concentraciones sanguíneas de grelina (Al Qarni et al., 2017), principal hormona orexigénica, y que esto puede provocar que aumente el apetito (Dong et al., 2006; Ishii et al., 2002).

Cuando existe hiperglucemia se ha reportado que se genera estrés oxidativo y que este está implicado en la modificación de señales celulares (Maiese, 2015). El estrés oxidativo tiene implicación importante en el hipotálamo, ya que es capaz de regular las señales que se llevan a cabo en esta zona del cerebro y por lo tanto puede regular el consumo de alimentos (Gyengesi et al., 2012). En nuestros resultados se observó que el nivel de MDA, producto de la lipoperoxidación que se utiliza como marcador de estrés oxidativo, tiende a aumentar en relación con el tiempo en el que se mantenga la hiperglucemia (7, 14 y 28 días). Estos son comparables en modelos animales de diabetes donde se ha determinado los niveles de MDA en plasma a los 28 días y donde se observó un aumento en los niveles de este marcador en comparación con el grupo control (Gwarzo et al., 2014).

Por otro lado, la actividad antioxidante endógena puede verse regulada por las concentraciones de EROs. Nuestros resultados muestran una tendencia a aumentar la actividad de la Gpx en condiciones de hiperglucemia. Esto puede ser debido, al aumento de las EROs, ya que se ha demostrado que las EROs son capaces de actividad al factor de transcripción factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2 (Nrf2), que reconoce a sitios específicos en el ADN conocidos como elementos de respuesta a antioxidantes (ARE) y que al unirse aumenta la expresión de las enzimas antioxidantes pudiendo significar un aumento en los niveles proteicos de la Gpx y por ende aumento en su actividad.

Aunado al aumento en la ingesta de alimentos y a la determinación del daño oxidativo, se evaluó la fosforilación de la AMPK en el hipotálamo, ya que esta cinasa es la

principal molécula que regula la ingesta de alimentos. Nuestros resultados muestran que la fosforilación de la AMPK tiende a aumentar con 7, 14 y 28 días de hiperglucemia. Esta tendencia en el aumento en la fosforilación puede estar relacionada con el establecimiento del posible estrés oxidativo, ya que se ha reportado que el estrés oxidativo provoca el aumento en los niveles de Ca^{2+} (Gyengesi et al., 2012; Raney and Turcotte, 2008), provocando una sobreactivación de CaMKK2 y el aumento en la fosforilación de la AMPK (Anderson et al., 2008), que podría llevar al aumento en la expresión de Npy y AgRP [31–33] y la disminución de POMC y CART (Havel et al., 2000; Ma et al., 2008; Oh et al., 2016).

Se ha reportado que durante la hiperglucemia se genera estrés oxidativo, este estado se relaciona con la modificación de señales celulares (Maiese, 2015). El estrés oxidativo tiene implicación importante en el hipotálamo, ya que es capaz de regular las señales que se llevan a cabo en esta zona del cerebro y por lo tanto puede regular el consumo de alimentos (Gyengesi *et al.*, 2012).

Para evaluar el efecto del RSV directamente sobre el tejido hipotalámico, se empleó el ensayo *ex vivo* y el medio Krebs-Heinseleit, este último para mantener a las células hipotalámicas vivas y funcionales (Bailey and Ong, 1978; Minasian *et al.*, 2013). Los tratamientos de RSV se emplearon a diferentes dosis, 50, 100 y 200 μ M, esto para evaluar su efectividad sobre los cambios en los niveles de MDA. De acuerdo con los resultados, se encontró que los niveles de MDA tienden a aumentar en el grupo HG en comparación con el grupo control, después de 28 días de HG. Al tratar el tejido hipotalámico con las diferentes dosis de RSV, se observó una tendencia a disminuir los niveles de MDA, en todas las dosis, 50, 100 y 200 μ M, en comparación con el grupo HG. Sadi and Konat, en el 2015, observaron que el RSV disminuye los niveles de MDA en cerebro de ratas diabéticas, así también en cultivos de eritrocitos sujetos a estrés oxidativo (Pandey and Rizvi, 2009). El RSV El efecto protector del RSV, es debido a su capacidad para neutralizar las ROS y siendo eficaz para inhibir la peroxidación lipídica de las membranas (Leonard *et al.*, 2003). Encontramos que el RSV induce el aumento en la actividad de la Gpx en la dosis de 50 μ M, pero caso contrario, esta actividad disminuye en la dosis de 200 μ M. Se ha demostrado que el RSV aumenta la

actividad de la Gpx en cerebro de ratas diabéticas (Sadi and Konat, 2015). Después de observar el efecto del RSV sobre el estrés oxidativo, analizamos por medio de WB la expresión de los receptores a grelina e insulina, importantes reguladores de la ingesta de alimentos en el hipotálamo (Kohno et al., 2008; Thon et al., 2016). Al analizar la expresión de GHS-R1a, observamos que su expresión aumenta en condiciones de hiperglucemia, mientras que el tratamiento con RSV, tanto en la concentración de 50, 100 y 200 μ M, disminuye la expresión de este receptor.

Considerando que el GHS-R1a regula positivamente el apetito, encontrar su expresión elevada en condiciones de HG nos aporta que este podría ser un mecanismo por el cual en condiciones diabéticas la hiperfagia se mantiene. Esta regulación positiva en la expresión puede ser acorde al estado de alimentación en el que se encuentre el animal, encontrando que en estados de ayuno prolongado aumenta la expresión de este receptor (Kim et al., 2003). Aunque se conoce que en condiciones de DM se mantiene la hiperfagia y esto se podría traducir a que no existe ayuno, a nivel celular las células carecen de entrada de glucosa, esto debido por la resistencia a la insulina o disminución de esta hormona que pueda regular correctamente la captación de glucosa (Alwahsh et al., 2017), así como también el funcionamiento correcto de neuronas que censan los niveles de glucosa y que a su vez regulan la señales a nivel del núcleo arcuato, principal núcleo que regula la ingesta de alimentos en el hipotálamo (Wang et al., 2004). Para el caso del receptor de insulina, encontramos una expresión variada en cada uno de los grupos, hay que considerar que la expresión del RI en el cerebro es poco estudiada, aunque en otros tejidos se ha encontrado que el estrés oxidativo puede regular tanto positiva y negativamente (Gual et al., 2005; Hayes and Lockwood, 1987).

Después de observar el aumento en la fosforilación de la AMPK en condiciones de hiperglucemia, se trató el tejido con RSV, encontrando que en dosis de 50 y 100 μ M la fosforilación de la AMPK disminuye. Este efecto puede ser debido a la capacidad antioxidante del RSV, ya que se ha reportado que en condiciones de EO aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular teniendo efecto sobre la activación de la CaMKK2 y este a su vez sobre la fosforilación de la AMPK, disminuyendo su fosforilación (Anderson et al., 2008). Por otra parte, observamos que la dosis de 200 μ M aumenta la fosforilación

de la AMPK. Este mecanismo puede ser debido que al RSV aparte de su capacidad antioxidante, se le ha atribuido otras funciones, como la de regular proteínas como puede ser las sirtuinas (Tian et al., 2016). Una de las sirtuinas, la SIRT1 es capaz de regular la fosforilación de la AMPK (Kulkarni and Cantó, 2015), y que esto puede ser dependiente de la dosis de RSV que se administró al sistema de estudio. Por último se analizó la expresión del neuropéptido Y, un neuropéptido orexigénico, encontrando que en condiciones de HG aumenta su expresión, y esto puede ser debido a la misma condición de EO que mantiene activada la vía de la AMPK tendiendo como consecuencia el aumento en la expresión de dicho neuropéptido (Namkoong et al., 2005). Al tratar el tejido con RSV observamos que no hay cambios en la expresión del NPY, se esperaba que la expresión de NPY disminuyera en relación con la disminución de la fosforilación de la AMPK. Se ha reportado que algunos antioxidantes exógenos y endógenos regulan la expresión, positiva y negativa, de neuropéptidos y que este podría ser el mecanismo que explique porque en ninguna de la dosis no observamos la disminución esperada (Kuo et al., 2015). Con esto se concluye que el estrés oxidativo regula la vía de señalización de la AMPK en el hipotálamo y que esto afecta la conducta alimentaria y que al estimular el tejido con un antioxidante (Resveratrol) el estrés oxidativo disminuye, estableciendo la vía de señalización de la AMPK.

Referencias

- Al Qarni, A.A., Joatar, F.E., Das, N., Awad, M., Eltayeb, M., Al-Zubair, A.G., Ali, M.E., Al Masaud, A., Shire, A.M., Gumaa, K., Giha, H.A., 2017. Association of Plasma Ghrelin Levels with Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus among Saudi Subjects. *Endocrinol. Metab.* 32, 230–240. <https://doi.org/10.3803/EnM.2017.32.2.230>
- Alwahsh, S.M., Dwyer, B.J., Forbes, S., van Thiel, D.H., Starkey Lewis, P.J., Ramadori, G., 2017. Insulin Production and Resistance in Different Models of Diet-Induced Obesity and Metabolic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18020285>
- Anamthathmakula, P., Sahu, M., Sahu, A., 2015. Evidence suggesting phosphodiesterase-3B regulation of NPY/AgRP gene expression in mHypoE-46 hypothalamic neurons. *Neurosci. Lett.* 604, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.003>
- Anderson, K.A., Ribar, T.J., Lin, F., Noeldner, P.K., Green, M.F., Muehlbauer, M.J., Witters, L.A., Kemp, B.E., Means, A.R., 2008. Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab.* 7, 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.02.011>
- Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C.R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S.R., Carling, D., Small, C.J., 2004. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J. Biol. Chem.* 279, 12005–12008. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300557200>
- 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., Diano, S., 2008. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454, 846–851. <https://doi.org/10.1038/nature07181>
- Bailey, L.E., Ong, S.D., 1978. Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. *J. Pharmacol. Methods* 1, 171–175. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(78\)90022-0](https://doi.org/10.1016/0160-5402(78)90022-0)
- Chen, S., Zhou, N., Zhang, Z., Li, W., Zhu, W., 2015. Resveratrol induces cell apoptosis in adipocytes via AMPK activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 608–613. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.034>
- Cheng, P.-W., Ho, W.-Y., Su, Y.-T., Lu, P.-J., Chen, B.-Z., Cheng, W.-H., Lu, W.-H., Sun, G.-C., Yeh, T.-C., Hsiao, M., Tseng, C.-J., 2014. Resveratrol decreases fructose-induced oxidative stress, mediated by NADPH oxidase via an AMPK-dependent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2739–2750. <https://doi.org/10.1111/bph.12648>
- Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., Kahn, B.B., 2012. p70S6 Kinase Phosphorylates AMPK on Serine 491 to Mediate Leptin's Effect on Food Intake. *Cell Metab.* 16, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.010>
- Diano, S., Liu, Z.-W., Jeong, J.K., Dietrich, M.O., Ruan, H.-B., Kim, E., Suyama, S., Kelly, K., Gyengesi, E., Arbiser, J.L., Belsham, D.D., Sarruf, D.A., Schwartz, M.W., Bennett, A.M., Shanabrough, M., Mobbs, C.V., Yang, X., Gao, X.-B., Horvath, T.L., 2011. Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat. Med.* 17, 1121–1127. <https://doi.org/10.1038/nm.2421>

- Dickson, E.J., Falkenburger, B.H., Hille, B., 2013. Quantitative properties and receptor reserve of the IP3 and calcium branch of Gq-coupled receptor signaling. *J. Gen. Physiol.* 141, 521–535. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210886>
- Dong, J., Peeters, T.L., De Smet, B., Moechars, D., Delporte, C., Vanden Berghe, P., Coulie, B., Tang, M., Depoortere, I., 2006. Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology* 147, 2634–2642. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1335>
- Drougard, A., Fournel, A., Valet, P., Knauf, C., 2015. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00056>
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2002. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocr. Rev.* 23, 599–622. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0039>
- Fisslthaler, B., Fleming, I., 2009. Activation and Signaling by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells. *Circ. Res.* 105, 114–127. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.201590>
- Gamber, K.M., Huo, L., Ha, S., Hairston, J.E., Greeley, S., Bjørnbæk, C., 2012. Over-Expression of Leptin Receptors in Hypothalamic POMC Neurons Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity. *PLOS ONE* 7, e30485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030485>
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C., Chaudière, J., 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1176–1183. <https://doi.org/10.1021/tx9701790>
- González-Garrido, J.A., García-Sánchez, J.R., Garrido-Llanos, S., Olivares-Corichi, I.M., 2017. An association of cocoa consumption with improved physical fitness and decreased muscle damage and oxidative stress in athletes. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 57, 441–447. <https://doi.org/10.23736/S0022-4707.16.06032-1>
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.-F., 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.10.019>
- Gwarzo, M.Y., Ahmadu, J.H., Ahmad, M.B., Dikko, A.U.A., 2014. Serum Glucose and Malondialdehyde Levels in Alloxan Induced Diabetic Rats Supplemented with Methanolic Extract of *Tacazzea Apiculata*. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* 10, 236–242.
- Gyengesi, E., Paxinos, G., Andrews, Z.B., 2012. Oxidative Stress in the Hypothalamus: the Importance of Calcium Signaling and Mitochondrial ROS in Body Weight Regulation. *Curr. Neuropharmacol.* 10, 344–353. <https://doi.org/10.2174/157015912804143496>
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., Schwartz, M.W., 1998. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 271–272. <https://doi.org/10.1038/1082>
- Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A., 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- Havel, P.J., Hahn, T.M., Sindelar, D.K., Baskin, D.G., Dallman, M.F., Weigle, D.S., Schwartz, M.W., 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.
- Hayes, G.R., Lockwood, D.H., 1987. Role of insulin receptor phosphorylation in the insulinomimetic effects of hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8115–8119.
- Huynh, M.K.Q., Kinyua, A.W., Yang, D.J., Kim, K.W., 2016. Hypothalamic AMPK as a Regulator of Energy Homeostasis. *Neural Plast.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2754078>
- Ishii, S., Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Sugihara, H., Oikawa, S., 2002. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. *Endocrinology* 143, 4934–4937. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220612>
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D.G., 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.003>
- Kamata, H., Hirata, H., 1999. Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cell. Signal.* 11, 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(98\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(98)00037-0)
- Keylor, M.H., Matsuura, B.S., Stephenson, C.R.J., 2015. Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products. *Chem. Rev.* 115, 8976–9027. <https://doi.org/10.1021/cr500689b>
- Kim, M.-S., Yoon, C.-Y., Park, K.-H., Shin, C.-S., Park, K.-S., Kim, S.-Y., Cho, B.-Y., Lee, H.-K., 2003. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *NeuroReport* 14, 1317–1320. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000078703.79393.d2>
- Kim, S.-J., Lee, Y.H., Han, M.-D., Mar, W., Kim, W.-K., Nam, K.-W., 2010. Resveratrol, purified from the stem of *Vitis coignetiae* Pulliat, inhibits food intake in C57BL/6J Mice. *Arch. Pharm. Res.* 33, 775–780. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0518-5>
- Ko, S.-Y., Ko, H.-A., Chu, K.-H., Shieh, T.-M., Chi, T.-C., Chen, H.-I., Chang, W.-C., Chang, S.-S., 2015. The Possible Mechanism of Advanced Glycation End Products (AGEs) for Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143345>
- Kohno, D., Sone, H., Minokoshi, Y., Yada, T., 2008. Ghrelin raises $[Ca^{2+}]_i$ via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 388–392. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.166>
- Kulkarni, S.S., Cantó, C., 2015. The molecular targets of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1852, 1114–1123. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.005>
- Kuo, D.-Y., Chen, P.-N., Hsieh, Y.-S., 2015. Targeting oxidative stress in the hypothalamus: the effect of transcription factor STAT3 knockdown on endogenous antioxidants-mediated appetite control. *Arch. Toxicol.* 89, 87–100. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1252-4>
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B., 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3, 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
- Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.-H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shi, X., 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 1017–1026.
- Lim, C.T., Kola, B., Korbonits, M., 2010. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 87–97. <https://doi.org/10.1677/JME-09-0063>

- Ma, W., Fuentes, G., Shi, X., Verma, C., Radda, G.K., Han, W., 2015. FoxO1 negatively regulates leptin-induced POMC transcription through its direct interaction with STAT3. *Biochem. J.* 466, 291–298. <https://doi.org/10.1042/BJ20141109>
- Ma, X., Zubcevic, L., Ashcroft, F.M., 2008. Glucose regulates the effects of leptin on hypothalamic POMC neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9811–9816. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800952105>
- Maiese, K., 2015. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 875961. <https://doi.org/10.1155/2015/875961>
- Maniscalco, J.W., Rinaman, L., 2014. Systemic leptin dose-dependently increases STAT3 phosphorylation within hypothalamic and hindbrain nuclei. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, R576–585. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00017.2014>
- Minasian, S.M., Galagudza, M.M., Dmitriev, Y.V., Kurapeev, D.I., Vlasov, T.D., 2013. Myocardial protection against global ischemia with Krebs-Henseleit buffer-based cardioplegic solution. *J. Cardiothorac. Surg.* 8, 60. <https://doi.org/10.1186/1749-8090-8-60>
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fougelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J., Kahn, B.B., 2004. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569–574. <https://doi.org/10.1038/nature02440>
- Modak, M., Dixit, P., Londhe, J., Ghaskadbi, S., Paul A. Devasagayam, T., 2007. Indian Herbs and Herbal Drugs Used for the Treatment of Diabetes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 40, 163–173. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.40.163>
- Namkoong, C., Kim, M.S., Jang, P.G., Han, S.M., Park, H.S., Koh, E.H., Lee, W.J., Kim, J.Y., Park, I.S., Park, J.Y., Lee, K.U., 2005. Enhanced Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase Activity Contributes to Hyperphagia in Diabetic Rats. *Diabetes* 54, 63–68. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.63>
- Oh, T.S., Cho, H., Cho, J.H., Yu, S.-W., Kim, E.-K., 2016. Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy* 12, 2009–2025. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1215382>
- 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. *Neurosci. Lett.* 619, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.03.011>
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34, 1093–1097. <https://doi.org/10.1139/H09-115>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Raney, M.A., Turcotte, L.P., 2008. Evidence for the involvement of CaMKII and AMPK in Ca²⁺-dependent signaling pathways regulating FA uptake and oxidation in contracting rodent muscle. *J. Appl. Physiol.* 104, 1366–1373. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01282.2007>

- Ren, H., Orozco, I.J., Su, Y., Suyama, S., Gutiérrez-Juárez, R., Horvath, T.L., Wardlaw, S.L., Plum, L., Arancio, O., Accili, D., 2012. G protein-coupled purinergic receptor GPR17 mediates orexigenic effects of FoxO1 in AgRP neurons. *Cell* 149, 1314–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.032>
- Roh, E., Kim, M.-S., 2016. Brain Regulation of Energy Metabolism. *Endocrinol. Metab.* 31, 519–524. <https://doi.org/10.3803/EnM.2016.31.4.519>
- Sadi, G., Konat, D., 2015. Resveratrol regulates oxidative biomarkers and antioxidant enzymes in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm. Biol.* 1–8. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1056311>
- Song, J., Huang, Y., Zheng, W., Yan, J., Cheng, M., Zhao, R., Chen, L., Hu, C., Jia, W., 2018. Resveratrol reduces intracellular reactive oxygen species levels by inducing autophagy through the AMPK-mTOR pathway. *Front. Med.* <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0655-7>
- Styskal, J., Van Remmen, H., Richardson, A., Salmon, A.B., 2012. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic. Biol. Med.* 52, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.441>
- Thomson, D.M., Herway, S.T., Fillmore, N., Kim, H., Brown, J.D., Barrow, J.R., Winder, W.W., 2008. AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 104, 429–438. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00900.2007>
- Thon, M., Hosoi, T., Ozawa, K., 2016. Possible Integrative Actions of Leptin and Insulin Signaling in the Hypothalamus Targeting Energy Homeostasis. *Front. Endocrinol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00138>
- Tian, Y., Ma, J., Wang, W., Zhang, L., Xu, J., Wang, K., Li, D., 2016. Resveratrol supplement inhibited the NF- κ B inflammation pathway through activating AMPK α -SIRT1 pathway in mice with fatty liver. *Mol. Cell. Biochem.* 422, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2807-x>
- Valassi, E., Scacchi, M., Cavagnini, F., 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 18, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.06.004>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- van Swieten, M.M.H., Pandit, R., Adan, R.A.H., van der Plasse, G., 2014. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* 61–62, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.05.004>
- Varela, L., Horvath, T.L., 2012. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* 13, 1079–1086. <https://doi.org/10.1038/embo.2012.174>
- Wang, R., Liu, X., Hentges, S.T., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E., Wang, W., Routh, V.H., 2004. The Regulation of Glucose-Excited Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus by Glucose and Feeding-Relevant Peptides. *Diabetes* 53, 1959–1965. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.8.1959>

- Yang, C.S., Lam, C.K.L., Chari, M., Cheung, G.W.C., Kokorovic, A., Gao, S., Leclerc, I., Rutter, G.A., Lam, T.K.T., 2010. Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase Regulates Glucose Production. *Diabetes* 59, 2435–2443. <https://doi.org/10.2337/db10-0221>
- Yasrebi, A., Hsieh, A., Mamounis, K.J., Krumm, E.A., Yang, J.A., Magby, J., Hu, P., Roepke, T.A., 2016. Differential gene regulation of GHSR signaling pathway in the arcuate nucleus and NPY neurons by fasting, diet-induced obesity, and 17 β -estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* 422, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.11.007>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W., 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, Q., Yang, C., Zhang, S., Zhang, L., Li, J., 2016. Alteration of NPY in hypothalamus and its correlation with leptin and ghrelin during the development of T2DM in a rat model. *SpringerPlus* 5, 1913. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3555-9>
- Zündorf, G., Reiser, G., 2011. Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1275–1288. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3359>