

Respuestas cardiovasculares al NaCl hipertónico inyectado en la región anteroventral del tercer ventrículo de ratas con hipertensión e insulinoresistencia inducidas por fructosa

Francisco J. Rosa^a, Eduardo Romero-Vecchione^a, José Vásquez^a, Rafael Antequera^a y Miriam Strauss^b

^aLaboratorio de Estudios Cardiovasculares. Escuela de Medicina J.M. de Vargas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. San José. Caracas. Venezuela.

^bSección de Biología Celular. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela. San José. Caracas. Venezuela.

Introducción y objetivos. Evaluar la respuesta simpática desencadenada por microinyección de NaCl 1,5 mol (2 µl) en la región anteroventral del tercer ventrículo cerebral de ratas alimentadas con fructosa a largo plazo.

Métodos. Se usaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley. El grupo control (n = 12) recibió dieta convencional y el grupo experimental, fructosa al 60% en comida convencional (n = 12) durante 6 meses.

Resultados. La fructosa produjo aumento de peso corporal, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperuricemia, hiperinsulinemia e hipertensión arterial, sin cambios en la frecuencia cardíaca basal. La respuesta hipertensiva por microinyección de 2 µl de NaCl 1,5 mol/l en la región anteroventral del tercer ventrículo cerebral (AV3V) fue mayor en las ratas alimentadas con fructosa; la presión arterial sistólica (PAS) aumentó 44,64, ± 3,6 mmHg y la diastólica (PAD) 19,9 ± 2,4 mmHg (p < 0,01); en el grupo control la PAS aumentó 28,33 ± 3,10 mmHg y la PAD 13,0 ± 1,9 mmHg sobre los valores basales (p < 0,01). La frecuencia cardíaca aumentó 23,0 ± 5,0 lat/min en el grupo control y 66,2 ± 8,4 lat/min (p < 0,01) en el grupo con fructosa.

Conclusiones. La administración de fructosa a largo plazo en la dieta produce hiperreactividad simpática del área AV3V al cloruro de sodio hipertónico, asociada con el desarrollo de hipertensión y resistencia insulínica.

Palabras clave: Hipertensión. Sistema nervioso autónomo. Glucosa. Insulina.

Cardiovascular Responses to Hypertonic NaCl Injection Into the Anteroventral Third Ventricle Region in Rats With Fructose-Induced Hypertension and Insulin Resistance

Introduction and objectives. To investigate the hemodynamic sympathetic response evoked by NaCl microinjection into the third ventricle anteroventral brain area (AV3V) in rats long-term fed with high fructose diet.

Methods. Twelve male rats received 60% fructose enriched diet for 6 months. Control rats (n=12) received regular diet.

Results. Fructose diet increased (P<.01) body weight; plasma glucose, triglycerides; cholesterol, insulin; systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP). Basal heart rate (HR) did not change. AV3V microinjection of 2 µL of hypertonic 1.5 M NaCl in fructose fed rats increased SBP 44.64(3.6) mm Hg, DBP 19.9(2.4) mm Hg and HR 66.2(8.4) beats/min over basal values (P<.01). In control rats, smaller responses were observed, SBP increased 28.33(3.10) mm Hg, DBP 13.0(1.9) mm Hg and HR 23.0(5.0) beats/min over basal values (P<.01).

Conclusions. Long-term fructose diet in rats induces cardiovascular hyperactivity of AV3V neurons to sodium chloride, and is associated to hypertension and insulin-resistance.

Key words: Hypertension. Autonomic nervous system. Glucose. Insulin.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

Este trabajo recibió apoyo financiero del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela a través del Proyecto de Investigación N.º PG 0900-5761-2004 y a través de Proyecto de Investigación del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente.

Correspondencia: Dr. F.J. Rosa.
Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Los Chaguaramos. 1050 Caracas. Venezuela.
Correo electrónico: frankrosa29@yahoo.com; garciel@ucv.ve

Recibido el 4 de octubre de 2006.

Aceptado para su publicación el 21 de mayo de 2007.

INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de inducir en animales de experimentación cambios parecidos al síndrome metabólico observado en humanos, se ha ensayado la administración a largo plazo de una dieta con alto contenido en fructosa¹, una dieta con alto contenido de sacarosa² y una dieta enriquecida en lípidos³. El modelo de dieta enriquecida en fructosa suministra-

ABREVIATURAS

AV3V: región anteroventral del tercer ventrículo de ratas.
 FC: frecuencia cardíaca.
 HOMA: evaluación metabólica homeostática.
 NaCl 1,5 mol: cloruro de sodio hipertónico 1,5 mol.
 PAD: presión arterial diastólica.
 PAS: presión arterial sistólica.

da a roedores por períodos de una semana⁴ a un mes⁵ induce cambios similares a los observados en el síndrome metabólico humano, como obesidad, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensión⁶.

Los pacientes con síndrome metabólico presentan un incremento del riesgo de eventos cardiovasculares^{7,8}. Estos pacientes presentan dislipemia, obesidad abdominal, hipertensión, hiperuricemia y mayor sensibilidad a la ingesta de sal como resultado de una reducción de la excreción renal de sodio^{9,10}; también muestran incremento de la reactividad vascular a la noradrenalina¹¹ y resistencia a la insulina asociada con el incremento de la actividad simpática. Todos ellos son factores que contribuyen al desarrollo de hipertensión arterial¹² observada en estos casos. La resistencia a la insulina se acompaña casi siempre de concentraciones plasmáticas elevadas de esta hormona, la cual posee actividad mitogénica en las fibras musculares lisas de las arterias y contribuye al aumento de la resistencia periférica y el desarrollo de aterosclerosis¹³⁻¹⁵. Igualmente, en el síndrome metabólico se ha observado una reducción de la ganancia de los barorreceptores, lo cual contribuye a sostener la hipertensión arterial¹⁶. Los pacientes con síndrome metabólico también muestran hipertrigliceridemia, reducción de la concentración de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y aumento de las partículas de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) pequeñas y densas¹⁷⁻¹⁹. Todos estos factores están asociados con la presencia de disfunción endotelial, lo cual reduce la función vasodilatadora arterial y aumenta aún más el riesgo de aterosclerosis^{20,21}.

La estimulación con cloruro de sodio hipertónico del área anteroventral del tercer ventrículo (AV3V) cerebral de la rata produce elevación de la presión arterial y la frecuencia cardíaca a través de eferencias simpáticas²²; esta respuesta a la estimulación de áreas cerebrales sensibles al NaCl, moduladoras de la presión arterial, no ha sido explorada en roedores alimentados con dieta enriquecida en fructosa. El objetivo de este trabajo fue evaluar la magnitud de la respuesta antes mencio-

nada en ratas con síndrome metabólico experimental inducido por la administración a largo plazo de una dieta enriquecida en fructosa durante 6 meses, un tiempo mayor al utilizado por otros investigadores.

MÉTODOS

Se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, con un peso inicial de 200-250 g, mantenidas en jaulas de acuerdo con las normas éticas de investigación en animales, con ciclos de 12 h de luz. El peso corporal fue registrado semanalmente con una balanza para animales pequeños.

Dieta

A un grupo de 12 ratas se les suministró una dieta especial enriquecida con fructosa al 60% mezclada en la comida comprimida (Catarina®) durante 6 meses y libre acceso al agua corriente filtrada. Al grupo control de 12 ratas se lo alimentó con comida comprimida comercial (Catarina®) sin fructosa, en las mismas condiciones antes descritas.

Ensayos bioquímicos

Se tomaron muestras sanguíneas al final del sexto mes de la administración de las dietas, se separó el plasma y se realizaron las siguientes determinaciones bioquímicas: glucosa, triglicéridos, colesterol total y ácido úrico, los cuales fueron analizados con un método estandarizado y automatizado de laboratorio (Spin React Lab®. Model 180).

La concentración sérica de insulina plasmática fue determinada con un kit especial ultrasensible de tipo análisis del inmunoabsorbente unido a la enzima (1,3 Ultrasensitive kit ALPCO®, Estados Unidos). La resistencia a la insulina se calculó de acuerdo con la ecuación usada en humanos, conocida como evaluación metabólica homeostática (HOMA)²³⁻²⁵ después de 12 h de ayuno.

Determinación de la presión arterial y la frecuencia cardíaca

La presión arterial y la frecuencia cardíaca fueron medidas mensualmente de forma no invasiva con un pletismógrafo digital de cola (Letica, Modelo 5001®, España).

Después de 6 meses de suministrar la dieta con un alto contenido de fructosa, las ratas que mostraron hipertensión, hiperinsulinemia y dislipemia fueron utilizadas para evaluar los efectos hemodinámicos producidos por la microinyección de NaCl hipertónico en la región AV3V del cerebro.

Efectos hemodinámicos producidos por la microinyección de NaCl hipertónico en AV3V

Las ratas alimentadas con ambas dietas fueron anestesiadas con pentobarbital 35 mg/kg, y la arteria y la vena femorales derechas, canuladas con catéteres de polietileno PE-50. El catéter arterial permitió el registro continuo de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) mediante un transductor tipo *strain-gauge*; el catéter venoso fue usado para la administración de soluciones o fármacos. La frecuencia cardíaca fue registrada con un tacógrafo (Letica, Modelo CAR 300, España) activado por las ondas de pulso de la presión arterial.

La cabeza de la rata fue sostenida en un aparato estereotáctico (David Kopf Instruments®, Estados Unidos), y las coordenadas para ubicar la región AV3V utilizadas, tomando como referencia el bregma, fueron las siguientes: anteroposterior 1,0 mm, lateral 0,5 mm, profundidad 7,5 mm²⁵.

Las microinyecciones de NaCl 1,5 mol fueron realizadas en 2 min con un agujero de acero inoxidable de 0,2 mm de diámetro, en un volumen de 2 µl con una jeringa Hamilton®; el espacio muerto fue considerado para el volumen de inyección.

La presión arterial y la frecuencia cardíaca fueron registradas en forma continua antes y después de la microinyección del NaCl hipertónico hasta el regreso de las variables a los valores basales. Se efectuaron experimentos de control con microinyecciones de 2 µl de líquido cefalorraquídeo artificial isotónico, como ha comunicado previamente nuestro laboratorio²², lo cual no induce ningún cambio hemodinámico (resultados no mostrados).

Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias fueron evaluadas con la prueba de la t de Student para datos no apareados. La t de Student para datos apareados se utilizó para comparar las diferencias entre los grupos inmediatamente antes y después de la microinyección de NaCl. La prueba de ANOVA fue utilizada para evaluar las posibles diferencias significativas entre las mediciones de los distintos grupos. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 11 para agilizar los cálculos estadísticos.

RESULTADOS

Después de 6 meses de suministrada la dieta enriquecida en fructosa, el peso de 12 ratas aumentó significativamente ($p < 0,05$) hasta 505 ± 37 g, en comparación con los 375 ± 26 g registrados en las que recibieron dieta convencional.

Las ratas alimentadas con dieta enriquecida en fructosa mostraron los siguientes cambios plasmáticos, después de 12 h de ayuno: glucemia, $110,2 \pm 5,1$ frente a control $63,0 \pm 2,2$ mg/dl; insulina plasmática, $42,9 \pm 8,3$ frente a control $18,3 \pm 7,4$ µU/ml; triglicéridos, $175,5 \pm 4,68$ frente a control $65,5 \pm 7,8$ mg/dl; colesterol total, $106,2 \pm 16,4$ frente a control $40,3 \pm 3,8$ mg/dl, y ácido úrico, $2,8 \pm 0,3$ frente a control $1,4 \pm 0,4$ mg/dl; estos cambios bioquímicos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,01$). El índice HOMA, calculado según la siguiente ecuación:

$$\text{HOMA} = \frac{\text{insulina plasmática en ayunas } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucemia en ayunas } (\text{mmol/l})}{22,5}$$

fue significativamente mayor ($p < 0,01$) en el grupo alimentado con fructosa; 11,63 frente a 2,78 en el grupo control.

Presión arterial y frecuencia cardíaca basal

La presión arterial al final del período de alimentación con fructosa fue la siguiente: PAS, $152,0 \pm 2,0$ mmHg (grupo control, $120,4 \pm 3,5$ mmHg) ($p < 0,01$); PAD, $116,4 \pm 2,13$ mmHg (grupo control, $74,58 \pm 2,49$ mmHg) ($p < 0,01$).

La frecuencia cardíaca basal no difirió significativamente ($p > 0,05$) entre controles ($344 \pm 6,70$ lat/min) y ratas alimentadas con fructosa ($345,5 \pm 7,67$ lat/min).

Cambios hemodinámicos por la microinyección de NaCl 1,5 mol en AV3V

Después de 6 meses de la administración de 2,0 µl de NaCl 1,5 mol en AV3V, la PAS aumentó $28,33 \pm 3,1$ mmHg sobre el valor basal en las ratas control. La misma microinyección de NaCl administrada en las ratas alimentadas con fructosa indujo un incremento mayor y significativo de la PAS de $44,64 \pm 3,6$ mmHg ($p < 0,01$) (fig. 1) sobre el valor basal. En las ratas control, la PAD aumentó $13,0 \pm 1,9$ mmHg sobre el valor basal y $19,9 \pm 2,4$ mmHg ($p < 0,01$) en las ratas alimentadas con fructosa (fig. 2).

Después de 6 meses, la frecuencia cardíaca aumentó $23,0 \pm 5,0$ lat/min sobre el valor basal en las ratas control y $66,2 \pm 8,4$ lat/min en las ratas alimentadas con fructosa con la microinyección de NaCl 1,5 mol en AV3V ($p < 0,01$) (fig. 3).

La respuesta hipertensiva y la taquicardia fueron de mayor duración en las ratas alimentadas con fructosa (70 ± 7 min), al compararla con las ratas que recibieron dieta convencional ($45,5 \pm 5,5$ min) ($p < 0,01$).

Fig. 1. Efecto de la microinyección de 2 µl de NaCl 1,5 mol en la región anteroventral del tercer ventrículo sobre la presión intraarterial sistólica (PAS) del grupo control (n = 12) y de ratas alimentadas con dieta enriquecida al 60% en fructosa (n = 12). Las barras muestran el promedio y las líneas verticales el error estándar de la media. *p < 0,01 frente a valor basal preinyección de NaCl 1,5 mol.

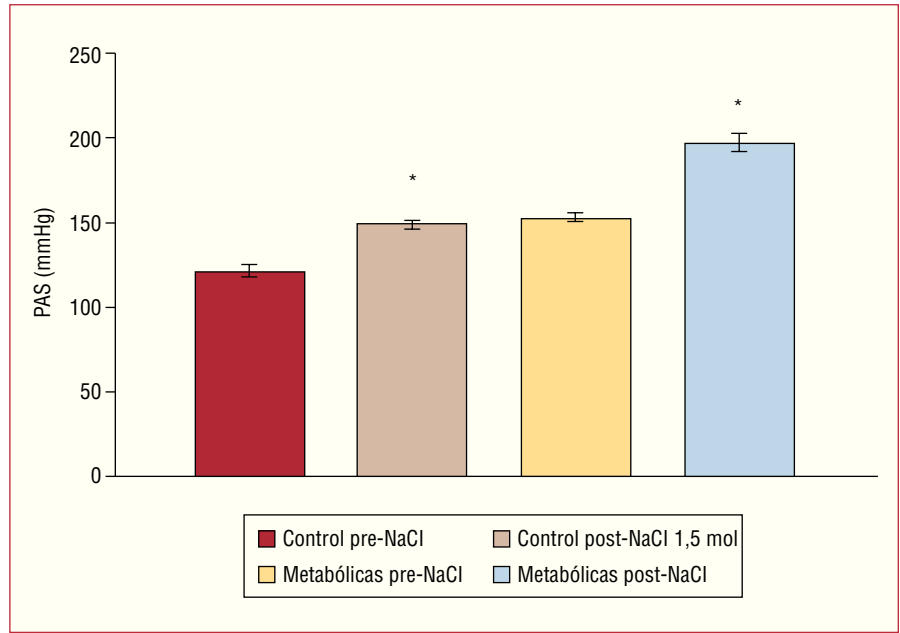
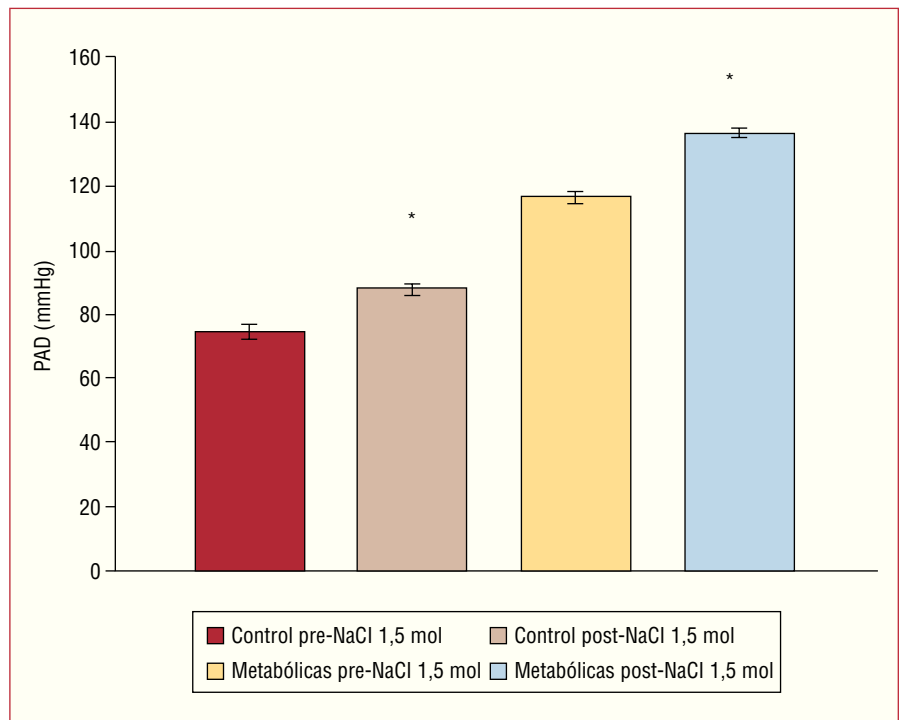


Fig. 2. Efecto de la microinyección de 2 µl de NaCl 1,5 mol en la región anteroventral del tercer ventrículo sobre la presión intraarterial diastólica (PAD) del grupo control (n = 12) y de ratas alimentadas con dieta enriquecida al 60% en fructosa (n = 12). Las barras muestran el promedio y las líneas verticales el error estándar de la media. *p < 0,01 frente a valor basal preinyección de NaCl 1,5 mol.



DISCUSIÓN

La administración de la dieta enriquecida con fructosa durante 6 meses indujo cambios metabólicos en el plasma mayores que los encontrados por los investigadores que la administraron entre 2 semanas y un mes. La administración más prolongada se basa en que la ingesta de macronutrientes en la dieta humana se lleva a cabo durante largos períodos de la vida, y 6 meses de suministro de esta dieta en las ratas corresponden

aproximadamente a 1/5 parte de la vida de este roedor. Este tiempo mayor de exposición a la fructosa aumentó la glucosa plasmática un 74,6% sobre el grupo con dieta convencional. Dicho aumento es mucho mayor que el obtenido con tiempos más cortos de administración; es decir, un 9,5% en dos semanas⁴ y un 11,5-12% después de un mes de suministrar la dieta rica en fructosa^{5,26}. Obviamente, el tiempo más prolongado de administración constituye un estímulo mayor y más prolongado para las células beta del páncreas^{1,26,27}. Por

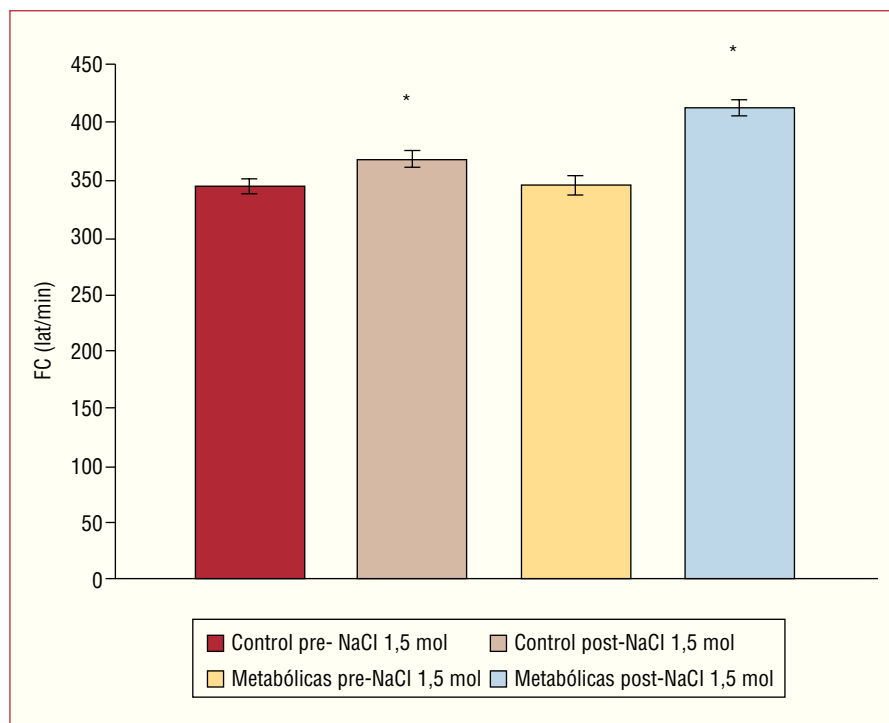


Fig. 3. Efecto de la microinyección de 2 µl de NaCl 1,5 mol en la región anteroventral del tercer ventrículo sobre la frecuencia cardíaca (FC) del grupo control ($n = 12$) y de ratas alimentadas con dieta enriquecida al 60% en fructosa ($n = 12$). Las barras muestran el promedio y las líneas verticales el error estándar de la media. * $p < 0,01$ frente a valor basal preinyección de NaCl 1,5 mol.

esta razón, probablemente, el aumento de insulina plasmática fue mayor en nuestros experimentos; es decir, 2,3 veces mayor que en el grupo control, a diferencia de lo obtenido con 7-30 días de dieta rica en fructosa, la cual produce aumentos de insulina en el rango del 0,41 al 2,16%, respectivamente^{1,4}.

El aumento de la concentración plasmática de insulina no fue suficiente para normalizar los valores de glucemia en los animales debido al desarrollo simultáneo de resistencia a la insulina, un hallazgo parecido al observado en la diabetes tipo 2^{28,29}.

La resistencia a la insulina fue demostrada en nuestros experimentos por el incremento en el índice HOMA a pesar de las limitaciones que presenta este índice como medida para estimar la sensibilidad a la insulina^{24,30}. Otros investigadores han demostrado resistencia a la insulina en ratas alimentadas con dieta de alto contenido en fructosa, y han utilizado un tiempo más corto de administración de dicha dieta^{1,5}.

El incremento de los triglicéridos plasmáticos es el resultado de la mayor ingesta de hidratos de carbono y del estado de resistencia a la insulina, como se ha observado en modelos experimentales y en el síndrome metabólico de los humanos. El mecanismo subyacente es la disminución de la síntesis y el almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo, provocado por reducción de la actividad de la lipoproteinlipasa en este tejido y el deterioro de la síntesis hepática de glucógeno³¹.

El aumento de colesterol plasmático obtenido en nuestros experimentos es similar al observado en ratas

sometidas a una dieta enriquecida en hidratos de carbono³².

La dieta con un alto contenido de fructosa incrementó el peso corporal debido a la acumulación de grasa en el tejido adiposo. Al final de los experimentos, la autopsia reveló macroscópicamente la acumulación extensa de tejido adiposo visceral que rodea los órganos abdominales en las ratas que recibieron la dieta enriquecida en fructosa, en comparación con lo observado en el grupo control. En concordancia con este hallazgo, se ha encontrado una mayor actividad simpática en pacientes obesos con disposición de grasa predominantemente visceral³³. Este mecanismo contribuye al desarrollo de hipertensión arterial en humanos y es probable que explique la hipertensión arterial encontrada en las ratas que reciben dieta enriquecida con fructosa durante largo tiempo.

La dieta con un alto contenido en fructosa puede inducir resistencia a la insulina por estimulación repetitiva de las células beta pancreáticas, lo cual produce un incremento de las concentraciones de insulina en plasma. La interacción incrementada de la insulina con sus receptores en los tejidos diana, como el muscular y el adiposo, altera el receptor y provoca autofosforilación de los residuos de tirosina en los dominios internos del receptor³⁴ y cambios en la expresión y distribución de los transportadores celulares de glucosa^{35,36}.

Otros mecanismos que pueden explicar la hipertensión observada en las ratas alimentadas con dieta rica en fructosa incluyen los siguientes: incremento

de la reabsorción de sodio en el riñón inducido por la hiperinsulinemia^{37,38}, reactividad arterial incrementada a la endotelina^{20,27,39}, reducción de la acción vasodilatadora endotelial¹⁸⁻²¹ e hiperactividad simpática provocada por el sodio al alcanzar las neuronas de la región AV3V, como hemos demostrado en este trabajo. Este aumento de la descarga simpática, inducido por el cloruro de sodio, es probablemente uno de los mecanismos que mantiene la elevación de la presión arterial en las ratas con dieta elevada en fructosa. El mecanismo por el cual los circuitos neuronales de AV3V se tornan hiperactivos al cloruro de sodio no está claro; una posibilidad podría ser un efecto sensibilizador provocado por la insulina elevada en el plasma al pasar en mayor concentración al área AV3V, la cual está exenta de barrera hematoencefálica. El área AV3V incluye el órgano subfornical y el órgano vasculoso de la lámina terminal, que poseen una permeabilidad incrementada a sustancias de alto peso molecular debido a la ausencia de la barrera antes citada^{40,41}. En concordancia con este argumento, experimentos en los cuales se aplicaron microinyecciones de insulina en el órgano subfornical y en las cercanías del área AV3V han demostrado tener un efecto hipertensor⁴².

CONCLUSIONES

1. La dieta con un alto contenido de fructosa administrada a largo plazo generó en los animales un cuadro metabólico de resistencia a la insulina e hipertensión arterial.

2. Nuestros experimentos demuestran que la dieta con alto contenido de fructosa induce una respuesta hipertensora exagerada a la estimulación del área AV3V con NaCl hipertónico (NaCl 1,5 mol).

BIBLIOGRAFÍA

- Hwang I, Ho H, Hoffman B, Reaven G. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*. 1987;10:512-5.
- Del Zotto H, Massa L, Gómez C, Gagliardino J. Changes induced by sucrose administration upon the morphology and function of pancreatic islets in the normal hamster. *Diabetes Metab Res Rev*. 1999;15:106-12.
- Setty S, Sun W, Tune J. Coronary blood flow regulation in the prediabetic metabolic syndrome. *Basic Res Cardiol*. 2003;98:416-23.
- Tobey TA, Mondon CE, Zavaroni I, Reaven G. Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. *Metabolism*. 1982;31:608-12.
- Reaven GM, Tranquilina R, Risser Y-D, Chan I, Reaven EP. Characterization of a model of diabetes-induced hypertriglyceridemia in young nonobese rats. *J Lipid Res*. 1979;20:371-7.
- Reaven G. Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. Parallels between human disease and rodent models. *Diabetes Care*. 1991;14:195-202.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002;287:359-9.
- Eckel R, Grundy S, Zimmet P. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365:1415-28.
- Moller D, Kaufman K. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Ann Rev Med*. 2005;56:45-62.
- Bigazzi R, Bianchi S, Baldari G, Campese VM. Clustering of cardiovascular risk factors in salt sensitive patients with essential hypertension: role of insulin. *Am J Hypertens*. 1996;9:24-32.
- Baron A D, Brechtel G, Johnson A. Interactions between insulin and norepinephrine on blood pressure and insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 1994;93:2453-62.
- Hernández del Rey R. Síndrome metabólico y sistema nervioso simpático. *Hipertensión*. 2005;22:23-31.
- Hsueh W, Lyon Ch, Quiñones M. Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med*. 2004;117:109-17.
- Sjöholm A, Nystrom T. Endothelial inflammation in insulin resistance. *Lancet*. 2005;365:610-3.
- Caballero E. Endothelial dysfunction, inflammation, and insulin resistance: a focus on subjects at risks for type 2 diabetes. *Current Diabetes Report*. 2004;4:237-46.
- Beske S, Alvarez G, Ballard T, Davy K. Reduced cardiovascular baroreflex gain in visceral obesity. Implications for the metabolic syndrome. *Am J Physiol*. 2001;282:H630-5.
- Reaven G, Chen YD, Jeppesen J, Matheux P, Krauss R. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense, low density lipoprotein particles. *J Clin Invest*. 1993;92:141-6.
- Goff D, D'Agostino R, Haffner S, Otvos J. Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations. Results from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Metabolism*. 2005;54:264-70.
- Saltiel A. The molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2000;106:163-4.
- Miller A, Hoenig M, Ujhelyi M. Mechanisms of impaired endothelial dependent relaxations associated with insulin resistance. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 1998;3:125-34.
- Katakam PV, Ujhelyi MR, Miller A. EDHF mediated relaxation is impaired in fructose-fed rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34:461-7.
- Rosa F, Vázquez J, Lupi, Lezama E, Romero-Vecchione E. Pharmacological modulation of the cardiovascular response to hypertonic NaCl injection in the anteroventral area of the rat brain third ventricle. *Pharmacology*. 1997;54:98-107.
- Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-9.
- Lebovitz HE. Clinician's Manual of Insulin Resistance. 1th ed. London: Science Press Ltd; 2002. p. 70.
- Pellegrino L, Pellegrino A, Cushman A. A stereotaxic atlas of the rat brain. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1979.
- Zavaroni I, Sander S, Scott S, Reaven G. Effect of fructose on insulin secretion and insulin action in the rat. *Metabolism*. 1980;29:970-3.
- Shafir E, Ziv E, Mosthaf L. Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to β -cell failure in animal models. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;892:223-46.
- Reaven G. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev*. 1995;75:473-86.
- Le Roith D. β -cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *Am J Med*. 2002;113:S3-11.
- Alberti K, Zimmet P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998;15:539-53.
- Klannemark M, Orho M, Langin D. The putative role of the hormone sensitive lipase gene in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Diabetologia*. 1998;41:1515-22.

32. Feingold K, Moser A. Effect of glucose or fructose feeding on cholesterol synthesis in diabetic animals. *Am J Physiol.* 1985; 249:G634-41.
33. Alvarez GE, Beske SD, Ballard TP, Davy KP. Sympathetic neural activation in visceral obesity. *Circulation.* 2002;106:2533-6.
34. Shullman G. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106:171-6.
35. Kotani K, Peroni O, Minokoshi Y, Boss O, Kahn B. GLUT 4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral utilization. *J Clin Invest* 2004;114:1666-75.
36. Maianu L, Keller S, Garvey T. Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulin-regulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus: Implications regarding defects in vesicle trafficking. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2001;86:5450-6.
37. Catena C, Giacchetti G, Novello M, Colussi G, Cavarape A, Secchi L. Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens.* 2003; 16:973-8.
38. Catena C, Cavarape A, Novello M, Giacchetti G, Secchi L. Insulin receptors and renal sodium handling in hypertensive fructose-fed rats. *Kidney Int.* 2003;64:2163-71.
39. Miller A, Tulbert C, Puskar M, Busija D. Enhanced endothelin activity prevents vasodilation to insulin in insulin resistance. *Hypertension.* 2002;40:78-82.
40. Muntzel MS, Thunhorst RL, Johnson AK. Effect of subfornical organ lesions on sympathetic nerve responses to insulin. *Hypertension.* 1996;29:1020-4.
41. Van Houten M, Posner BI, Kopriwa BM, Brawer JR. Insulin binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology.* 1979;105:666-73.
42. Muntzel M, Beltz T, Mark A, Johnson AK. Anteroventral neural responses to hyperinsulinemia. *Hypertension.* 1994;23:1059-62.