

Resistencia a la insulina durante el envejecimiento: ¿un proceso mediado por leptina?

José M^a Carrascosa

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid

Existen abundantes datos en la literatura que demuestran la asociación en humanos entre envejecimiento y la disminución de la tolerancia a la glucosa, determinada ésta mediante el test de tolerancia oral (TTOG) o el de tolerancia intravenosa (TTIVG) (1). Por otra parte, el uso de la técnica de anclaje euglicémico-hiperinsulinémico ha permitido demostrar que la intolerancia a la glucosa observada en individuos de edad avanzada es debida a la presencia de resistencia periférica a la insulina (2-4). No obstante, es bien sabido que el envejecimiento en humanos está generalmente asociado con cambios en la composición corporal, caracterizados principalmente por un incremento de la masa grasa, lo que hace difícil discernir en qué medida la disminución de la sensibilidad a insulina es consecuencia del envejecimiento como tal o, por el contrario, viene causada por el incremento de la adiposidad. Diversos estudios en los que se utilizaron individuos no obesos de diferentes edades llegaron a la conclusión de que la edad tenía una influencia significativa sobre el descenso de la sensibilidad a la insulina (2-4). Sin embargo, estudios más recientes en los que se incluyeron individuos con un amplio rango de Índice de Masa Corporal (IMC) han sugerido que la resistencia a la insulina en individuos de edad avanzada deriva exclusivamente de los cambios en la composición corporal y el incremento de la masa grasa asociados a la edad (5-6). Dado que el efecto de la edad, si existe, debe ser más bien pequeño, la enorme heterogeneidad de las poblaciones humanas respecto a factores tales como diferencias en dieta, sedentarismo, bienestar, etc..., impide en gran medida establecer con certeza si existe un efecto significativo de la edad sobre el desarrollo de la resistencia a la insulina.

El uso de modelos animales para estudios de envejecimiento permite limitar el problema de la heterogeneidad propia de las poblaciones humanas. La disminución de la sensibilidad a insulina con la edad en condiciones de euglicemia e hiperinsulinemia ha sido observada también en ratas Wistar (7-8), Sprague-Dawley (9-11) y Fischer (12). No obstante, la rata experimenta también un incremento de peso y de masa grasa durante el envejecimiento lo que dificulta a su vez diferenciar entre los efectos de la edad y los debidos al cambio en la composición corporal. Un trabajo reciente llevado a cabo en ratas F344/BN ha puesto de manifiesto que la eliminación mediante cirugía de la grasa visceral evita el desarrollo de resistencia a insulina con la edad (13) sugiriendo que ésta es la principal, si no única responsable del deterioro de la sensibilidad a la insulina.

En este trabajo se presentan los datos obtenidos por nuestro grupo utilizando la rata Wistar como modelo experimental. La rata Wistar se mantiene normoglucémica y normoinsulinémica hasta los dos años de edad y, aunque experimenta un incremento de peso significativo y un aumento del porcentaje de grasa visceral, no muestra variaciones significativas del índice de obesidad de Lee (ver Tabla 1), ni del tamaño del adipocito, dos parámetros que dan idea de la ausencia de obesidad patológica. Con objeto de estudiar la influencia que pudiera tener el aumento de adiposidad sobre la sensibilidad a la insulina, se han estudiado también animales sometidos a restricción calórica suave la cual induce una disminución del peso de grasa visceral (Tabla 1).

Tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina

Aunque durante el envejecimiento de la rata Wistar no se observan variaciones significativas de las concentraciones de glucosa e insulina en sangre tras un ayuno nocturno (Tabla 1), ello no significa que no se produzcan alteraciones en la tolerancia a la glucosa con la edad, las cuales podrían no haber llegado a causar perturbaciones del control glicémico. Dicha posibilidad se ha explorado sometiendo a un TTOG a ratas de 3, 8 y 24 meses de edad, observándose que la evolución de la concentración de glucosa en sangre tras la sobrecarga oral es muy similar en las tres edades estudiadas (ver Tabla 1, área debajo de la curva para glucosa). Estos datos implican que durante el envejecimiento la rata Wistar mantiene la tolerancia a la glucosa. No obstante, el análisis de la evolución de la concentración de insulina demuestra que el mantenimiento de la tolerancia a la glucosa se alcanza en presencia de niveles de insulina que aumentan significativamente con la edad (Tabla 1; área debajo de la curva para insulina), lo que sugiere una menor respuesta global a la insulina en las ratas viejas. Utilizando el cociente entre las áreas debajo de la curva para glucosa e insulina respectivamente como un índice de sensibilidad global a insulina, puede observarse que existe una disminución significativa de la sensibilidad en animales de 8 meses respecto a los controles jóvenes de 3 meses de edad. Igualmente, hasta la edad de 24 meses se produce una nueva disminución de la sensibilidad a la insulina. Resulta interesante comprobar que la disminución de sensibilidad observada a la edad de 8 meses va acompañada de un incremento acusado de la adiposidad visceral. Sin embargo, el posterior deterioro de la acción insulínica se produce en ausencia de un incremento en el índice de adiposidad.

Con objeto de estudiar con mayor profundidad la dependencia entre sensibilidad a insulina, edad y adiposidad visceral, se sometieron ratas de 5 y 21 meses de edad

respectivamente a un protocolo de restricción calórica consistente en disminuir la ingesta un 20% respecto a lo habitual durante un período de tres meses. Dicho protocolo permite obtener ratas de 8 y 24 meses de edad con porcentajes de grasa visceral similares, e inferiores a los observados en las ratas de 3 meses no sometidas a restricción calórica (Tabla 1). Al realizar el TTOG en estos animales puede observarse que en ambos casos la tolerancia a la glucosa se mantiene normal, pero mientras en los animales de 8 meses la insulina necesaria disminuye acusadamente, no se aprecian cambios en las ratas de 24 meses. Estos datos permiten concluir que la restricción calórica induce un aumento significativo de la sensibilidad a la insulina a los 8 meses de edad, pero no a edades más avanzadas, independientemente de que en ambos casos se produce una disminución del índice de adiposidad similar. Por consiguiente, es posible disociar el cambio en sensibilidad a insulina de la variación en el contenido de grasa visceral, al tiempo que se observa una influencia de la edad como tal sobre dicha sensibilidad a insulina.

Otra aproximación experimental para el análisis de la resistencia a insulina asociada a la edad consiste en la determinación del consumo global de glucosa en condiciones de anclaje euglicémico-hiperinsulinémico. Un estudio previo de nuestro laboratorio demostró que dicho consumo disminuía en ratas de 24 meses de edad respecto a los jóvenes controles de 3 meses, a dos dosis de insulina diferentes (8). La extensión de dicho estudio a animales de 8 meses de edad ha puesto de manifiesto que el declive en el consumo de glucosa en situación de hiperinsulinemia es progresivo y se observa ya a los 8 meses de edad. Además, la restricción calórica induce un incremento significativo del consumo de glucosa en animales de 8 meses, pero en ratas de 24 meses sólo se observa un aumento a la dosis inferior de insulina, sin cambios en el consumo máximo. Estos resultados confirman lo indicado anteriormente en los TTOG.

Además del análisis del consumo global de glucosa en condiciones de euglicemia e hiperinsulinemia, se han estudiado los cambios en el consumo de glucosa de diversos tejidos diana de la insulina. Los datos resumidos en la Tabla 2 indican que el tejido adiposo visceral, tanto epididimal como retroperitoneal, muestra resistencia a la insulina a los 8 meses de edad, resistencia que se mantiene en los animales de 24 meses. De un modo similar a lo observado para el consumo de glucosa global, la restricción calórica mejora la captura de glucosa en respuesta a insulina sólo en los animales de 8 meses de edad, pero no en los de 24 meses.

En lo concerniente al tejido muscular, los datos recogidos en la Tabla 2 demuestran que existen diferencias relevantes entre los diferentes músculos analizados. Así, los músculos más oxidativos como el soleus y el diafragma muestran una disminución en la captura máxima de glucosa en ratas de 24 meses de edad, pero no en las de 8 meses, lo que indica que la resistencia a la insulina en dichos músculos se desarrolla con posterioridad a la observada en el tejido adiposo blanco. Por el contrario, el cuádriceps mantiene su sensibilidad a la insulina con la edad, no apreciándose diferencias en el consumo de glucosa a concentraciones saturantes de insulina a ninguna de las edades analizadas. Las fibras musculares del cuádriceps son mayoritariamente de tipo 2a y 2b, las cuales tienen un carácter más glucolítico que oxidativo y muestran escasa capacidad para oxidar ácidos grasos. Es probable que, al contrario de lo observado en los músculos más oxidativos, el consumo de glucosa en el cuádriceps no se vea influenciado por la mayor disponibilidad de ácidos grasos que debe tener lugar como consecuencia de la resistencia a insulina del tejido adiposo.

En los animales sometidos a restricción calórica, tanto de 8 como de 24 meses de edad, no se observa un incremento del consumo máximo de glucosa en soleus y diafragma. Sin embargo, a concentraciones subsaturantes de insulina la captura de glucosa se ve incrementada en ambos músculos a las dos edades analizadas lo que sugiere que la restricción calórica induce una mejora de la sensibilidad a la insulina de estos músculos, aunque no de su respuesta máxima. Conviene reseñar que la restricción nutricional induce una disminución del consumo de glucosa en situación basal por lo que si se analiza el incremento inducido por la insulina se observa que en situación de restricción calórica la estimulación por la hormona es entre un 150% y un 200% superior en diafragma y músculo soleus en ratas de 8 meses de edad, respecto a sus controles alimentadas *ad libitum*.

Los datos de captura de glucosa en soleus y diafragma están en concordancia con los relativos al consumo global de glucosa observados en animales de 24 meses de edad. Sin embargo, en ratas de 8 meses de edad existe coincidencia a concentraciones subsaturantes de insulina, pero no permiten explicar el incremento observado en la captura global de glucosa tras la restricción nutricional a concentraciones saturantes de la hormona. Una posibilidad para explicar esta discrepancia es que otros tejidos musculares no analizados experimenten un incremento en la captura de glucosa en situación de hiperinsulinemia tras la restricción nutricional, de un modo análogo a lo observado en el tejido adiposo blanco. Alternativamente, puede pensarse que el tejido

hepático, en estas condiciones, consume glucosa para reponer las reservas de glucógeno probablemente mermadas tras la restricción calórica.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la resistencia a insulina se desarrolla de un modo paulatino con la edad en la rata Wistar, existiendo una contribución diferenciada de los distintos tejidos diana de la insulina a dicha resistencia. Puede afirmarse que el tejido adiposo visceral es el primero en manifestar insensibilidad a la insulina, la cual es detectable a los 8 meses de edad, mientras que músculos como el soleus o el diafragma desarrollan resistencia a edades más avanzadas, y otros como el cuádriceps permanecen sensibles incluso hasta los 24 meses de edad. Estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis sobre el origen de la resistencia a insulina en ratas obesas que sugiere que la resistencia a insulina del tejido adiposo constituye el fenómeno desencadenante de la resistencia global a la hormona (14). Por otra parte, la restricción calórica moderada resulta eficaz en animales de 8 meses de edad, en los que se observa una clara mejora de la respuesta a insulina en tejido adiposo, pero carece de efecto en ratas de 24 meses de edad tanto en lo que a la captura global de glucosa se refiere, como a la sensibilidad del tejido adiposo. Diversos autores han postulado que la adiponectina, un factor peptídico secretado por el tejido adiposo, induce un incremento de la sensibilidad a la insulina y su concentración plasmática disminuye en situaciones de resistencia como la obesidad o la diabetes tipo 2 (15). Aunque los niveles de adiponectina no se ven modificados con la edad, hay que resaltar que su concentración en plasma aumenta en animales de 8 meses de edad tras la restricción calórica, mientras que permanece invariable en los de 24 meses de edad (Tabla 1). Este hecho permite sugerir que la adiponectina podría ser responsable, al menos parcialmente, del efecto de la restricción calórica sobre la sensibilidad a la insulina.

Hiperleptinemia y cambios en la acción de la leptina con la edad

Entre los cambios más significativos que se observan en la rata Wistar con la edad, uno de ellos es el incremento de la adiposidad visceral (Tabla 1). Actualmente el tejido adiposo blanco se considera no sólo como un tejido de depósito de reservas grasas sino como un órgano endocrino responsable de la producción de diversos factores entre los que se encuentran algunos implicados en la regulación de la homeostasis calórica y la sensibilidad a la insulina, tales como leptina, adiponectina o resistina (16,17). Por consiguiente, el aumento de la adiposidad con la edad podría estar

asociado al incremento de la concentración en sangre de alguna de estas adipoquinas, que podría ser a su vez responsable del desarrollo de la resistencia a insulina característica del envejecimiento. Los datos mostrados en la Tabla 1 indican que los niveles de leptina en sangre aumentan progresivamente con la edad alcanzándose valores a los 24 meses de edad incluso cinco veces superiores a los observados en ratas de tres meses. Asimismo, la restricción calórica durante tres meses induce una disminución de la concentración de leptina en sangre que llega a niveles inferiores a los controles en los animales de 8 meses de edad. Sin embargo, en ratas de 24 meses la concentración de leptina después de la restricción calórica se mantiene por encima de la observada en animales de 3 meses de edad. Existe, por tanto, una correlación inversa entre la evolución de los niveles de leptina en sangre con la edad y la restricción calórica, y la sensibilidad global a la insulina determinada en los ensayos de tolerancia oral a la glucosa y en los experimentos de anclaje euglicémico-hiperinsulinémico mencionados anteriormente, lo que permite postular que la leptina podría ser el factor adipocitario responsable de la aparición de resistencia a la insulina con la edad.

La leptina fue identificada en 1994 como el producto del gen *ob* asociado a la obesidad en ratón (18) y un año más tarde se describió su receptor celular que resultó ser el producto del gen *db* asociado también a la obesidad murina (19). La leptina es producida mayoritariamente por el tejido adiposo y, una vez liberada al torrente sanguíneo, ejerce su acción a nivel central interaccionando principalmente con diversos núcleos hipotalámicos implicados en el control de la homeostasis calórica. La unión de leptina a su receptor en el hipotálamo modula la expresión y liberación de neuropéptidos tales como NPY, Melanocortina, AGRP o CART entre otros, lo que conlleva la inhibición de la ingestión de alimentos y el incremento del gasto calórico regulando de este modo el balance energético (20-24). Aunque estos hechos despertaron inicialmente grandes expectativas sobre las posibilidades de utilización de la leptina en el control de la obesidad, se ha demostrado con posterioridad que, tanto en humanos como en roedores, la obesidad está generalmente asociada a hiperleptinemia y a un estado de resistencia central a la acción de la leptina (25,26). Por consiguiente, considerando que la concentración de leptina circulante está aumentada en la rata vieja (Tabla 1), parece probable que, paralelamente al desarrollo de la resistencia a insulina con la edad, se presente a su vez un estado de resistencia central a la acción de la leptina.

Para abordar esta cuestión se han llevado a cabo estudios en los que se infundió leptina durante siete días en el ventrículo cerebral lateral mediante la implantación de bombas osmóticas cargadas con diferentes concentraciones de la misma, analizándose la evolución del peso corporal y la ingesta de los animales (27). Las ratas de 3 meses de edad experimentan un descenso máximo del peso corporal de 20g con una dosis diaria de 0,2 μg de leptina. Por el contrario, los animales de 24 meses de edad no sufren ningún descenso significativo en su peso corporal a dicha dosis de leptina, aunque con una dosis de 10 μg diarios experimentan una disminución del mismo similar a la observada en ratas de 3 meses. En lo concerniente a la ingesta, las ratas de 3 meses de edad muestran una disminución dosis-dependiente, pasando la ingestión diaria de alimento de 23g en ausencia de leptina a alrededor de 14g en respuesta a una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{día}$. En ratas de 24 meses de edad la ingesta es de algo más de 23,5 g diarios en ausencia de leptina. La dosis intermedia de 0,2 $\mu\text{g}/\text{día}$ no induce cambios en la magnitud de la ingesta mientras que a la dosis superior se observa un descenso de la misma hasta un valor de aproximadamente 15g diarios. Estos datos indican que el envejecimiento en la rata está asociado a una disminución de la sensibilidad central a la leptina, si bien puede alcanzarse una respuesta máxima similar a la observada en animales de 3 meses de edad (27).

Con objeto de comprobar si la restricción calórica puede revertir este estado de resistencia central a la leptina, se trataron con leptina, tal como se ha indicado anteriormente, ratas de 24 meses de edad sometidas durante tres meses a restricción calórica. Para estos estudios se escogió una dosis de 0,2 $\mu\text{g}/\text{día}$ de leptina que carece de efecto en los animales de 24 meses de edad alimentados *ad libitum*. Los animales infundidos con solución salina muestran un marcado incremento de la ingesta durante el tratamiento, la cual se estabiliza alrededor de los 41g diarios, y experimentan un incremento del peso corporal próximo a los 50g. Por el contrario, las ratas infundidas con leptina muestran un incremento de la ingesta más moderado, que se estabiliza alrededor de los 28g diarios, y no experimentan ningún incremento en el peso corporal. Puede afirmarse, por tanto, que la respuesta central a la leptina se recupera en las ratas viejas de 24 meses de edad como consecuencia de la restricción calórica, en contraposición con lo observado para la resistencia a la insulina (27).

La acción hipotalámica de la leptina se inicia mediante su unión al receptor Ob-Rb, producto del gen *ob*. Dicho receptor pertenece a la familia de receptores de

citoquinas y su activación estimula la quinasa JAK2 la cual fosforila al receptor en residuos de tirosina (28-30). El receptor fosforilado induce la asociación al mismo de varias proteínas entre las que cabe mencionar STAT-3 (proteína transdutora de señales y activadora de la transcripción-3; *Signal Transducer and Activator of Transcription-3*). Esta última, tras fosforilarse se transloca al núcleo en donde promueve la expresión génica. Entre los genes cuya expresión se ve incrementada por la acción de STAT-3 se encuentra el correspondiente a la proteína SOCS-3 (proteína supresora de la señal de citoquinas-3, *Suppressor of Cytokine Signaling-3*) la cual induce la finalización de la señal de leptina al unirse al receptor OB-Rb e inhibir a JAK2 (30).

Con objeto de descifrar las bases moleculares de la resistencia a la leptina con la edad, se analizó la presencia en hipotálamo del receptor de leptina Ob-Rb en los diferentes grupos. El análisis mediante RT-PCR puso de manifiesto que la expresión del receptor de leptina Ob-Rb no se ve modificada en las ratas de 8 meses de edad en relación a la observada en animales jóvenes. Sin embargo, en ratas de 24 meses de edad se aprecia una disminución importante de la expresión hasta valores del 15-20% de la correspondiente a animales de 3 meses de edad (27). La restricción calórica no modifica la expresión del receptor de leptina en animales de 8 meses de edad, pero induce un incremento significativo en las ratas de 24 meses. El análisis mediante técnicas de inmunohistoquímica de cortes del núcleo arcuato hipotalámico confirma que la cantidad de receptor de leptina sigue un comportamiento similar al de su mRNA, disminuyendo a los 24 meses de edad y experimentando una recuperación tras la restricción calórica (27). De estos datos puede concluirse que la resistencia a la leptina observada en animales de 24 meses de edad puede atribuirse, al menos parcialmente, a la disminución de la cantidad de receptor de leptina disponible para la transmisión de su señal, lo cual podría ser consecuencia de la exposición prolongada a niveles elevados de la misma dado su incremento en sangre con la edad.

Además de los cambios mencionados en el receptor de leptina, se ha estudiado la influencia de la edad y la restricción calórica en la expresión de SOCS-3. Los datos obtenidos demuestran que la expresión hipotalámica de SOCS-3 aumenta alrededor de 2,5 veces en animales de 24 meses de edad respecto a los controles de 3 meses, mientras que en ratas de 8 meses de edad no se observa todavía ningún incremento (31). La restricción calórica disminuye ligeramente la expresión de SOCS-3 a los 8 meses de edad, y alrededor del 50% en los animales de 24 meses de edad (31). Por consiguiente, además de la disminución en la cantidad de receptores de leptina que tiene lugar con la

edad, su señal se encuentra probablemente inhibida debido a la mayor presencia de SOCS-3 lo que explicaría el estado de resistencia a leptina característico de las ratas de 24 meses. Del mismo modo, la recuperación de la respuesta a la leptina que se produce como resultado de la restricción calórica puede explicarse no sólo por el incremento en el número de receptores Ob-Rb, sino por la disminución de la proteína SOCS-3 encargada de finalizar la señal celular de la leptina.

Efecto de la acción central de la leptina sobre la sensibilidad a insulina del tejido adiposo blanco.

Existen muchas evidencias experimentales que indican que la leptina regula la homeostasis de la glucosa. En ratones obesos *ob/ob* y en ratones que sufren lipodistrofia, cuyos niveles de leptina en sangre son indetectables, el tratamiento periférico con leptina revierte el fenotipo diabético de los mismos y la resistencia a insulina que los caracteriza (32-34), y lo mismo se ha observado en pacientes lipodistróficos tratados con leptina (35). Por el contrario, en ratones *db/db* y ratas *fa/fa* (que carecen de receptor de leptina), así como en humanos y roedores que presentan obesidad e hiperleptinemia asociada, la administración de leptina no revierte la intolerancia a la glucosa ni la resistencia a insulina, probablemente debido a la presencia de resistencia a la leptina (36).

En general la leptina actúa como un factor de sensibilización a la insulina en rata, si bien se han puesto de manifiesto efectos específicos en diferentes tejidos (36). Así, por ejemplo, la inyección de leptina en el núcleo ventromedial hipotalámico induce un aumento de la captura de glucosa por parte del tejido adiposo marrón y los músculos cardíaco y esquelético (37). Asimismo, la infusión subcutánea de leptina durante 7 días conlleva un incremento de la captura de glucosa en condiciones de anclaje euglicémico-hiperinsulinémico en músculo esquelético y tejido adiposo marrón (38,39). Sin embargo, en tejido adiposo blanco la leptina parece ejercer un efecto inhibitorio sobre la acción de insulina (36,37). Habida cuenta de que los niveles circulantes de leptina se encuentran incrementados en ratas de 8 meses de edad (31), las cuales mantienen niveles hipotalámicos de receptor Ob-Rb y SOCS-3 normales, puede postularse que esta situación conllevaría una mayor señal central de leptina que, a través del sistema nervioso autónomo, podría inducir un estado de resistencia a la insulina en el tejido adiposo. Con objeto de comprobar esta hipótesis, se implantaron bombas osmóticas conteniendo leptina o solución salina en ratas de 3 meses de edad, tal como se ha

indicado en el apartado anterior, y tras un período de siete días se procedió al estudio de la sensibilidad a insulina en adipocitos aislados analizando la estimulación por la hormona de la actividad MAP quinasa y de la fosforilación de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3). Los datos obtenidos demuestran que la infusión de leptina (0,2 µg/día) disminuye significativamente la estimulación de la actividad MAP quinasa por insulina, la cual pasa de ser superior a dos veces en adipocitos procedentes de ratas infundidas con solución salina, a menos de 1,4 veces en adipocitos obtenidos de animales infundidos con leptina. Resultados similares se obtienen también utilizando dosis más altas de leptina. En lo concerniente a GSK3, la leptina ejerce un efecto similar bloqueando la capacidad de la insulina para estimular la fosforilación de dicha enzima (40).

Se ha estudiado también el efecto del tratamiento central con leptina en ratas de 24 meses que se habían caracterizado previamente como resistentes a leptina (27). Al estudiar la estimulación de MAP quinasa por insulina en adipocitos aislados de estos animales, el efecto estimulador es muy inferior al observado en adipocitos de ratas jóvenes (~1,3 veces frente a más de 2 veces de estimulación en ratas de 3 meses de edad). La infusión central de leptina en estos animales no induce cambios en la sensibilidad a insulina de los adipocitos aislados, lo que puede ser consecuencia del hecho de que ya muestran resistencia a insulina por sí mismos, o de que las ratas de 24 meses presentan resistencia central a la leptina tal como se ha indicado anteriormente. Con objeto de esclarecer este punto se procedió al estudio de la estimulación por insulina de la actividad MAP quinasa en adipocitos procedentes de ratas de 24 meses de edad sometidas previamente a restricción calórica durante tres meses. Aunque el efecto de insulina sobre la captura de glucosa por el tejido adiposo no experimenta un aumento significativo después de la restricción calórica, la estimulación de MAP quinasa por insulina en adipocitos aislados alcanza valores de alrededor de 1,8 veces. La infusión central de leptina a estas ratas de 24 meses sometidas a restricción nutricional bloquea la capacidad de la insulina para estimular la actividad MAP quinasa en adipocitos aislados (40). Estos datos confirman que la falta de efecto de leptina observada en los animales de 24 meses de edad es consecuencia de la resistencia central a la leptina, y que una vez restaurada la sensibilidad a la misma tras la restricción calórica, la sensibilidad a insulina del tejido adiposo vuelve a estar modulada por la acción central de leptina.

Los datos disponibles hasta el momento confirman, por tanto, la capacidad de la leptina para modular la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo actuando a través de

sus dianas en el hipotálamo. Aunque las señales resultantes de dicha acción de la leptina y el mecanismo mediante el cual interaccionan con la señal insulínica del adipocito no se conocen, dicha regulación debe estar mediada por el sistema nervioso autónomo. La investigación de dicho mecanismo regulador en animales en los que se proceda a la denervación del tejido adiposo proporcionará sin duda una información muy valiosa al respecto. Este mecanismo regulador debe contribuir a la acción lipostática de la leptina, al inhibir los efectos lipogénico y antilipolítico de la insulina. Sin embargo, al elevarse de un modo permanente la concentración plasmática de leptina, como ocurre a lo largo de la vida, es previsible que se establezca un estado de insensibilidad a insulina que conlleve a largo plazo un estado generalizado de resistencia a insulina en la mayor parte de los tejidos. Cabe señalar que la resistencia a insulina del tejido adiposo parece desencadenar la resistencia global a la insulina (14).

Efecto de la acción directa de leptina sobre la sensibilidad a insulina del tejido adiposo blanco.

Aunque la leptina actúa preferentemente mediante la interacción con su receptor en núcleos hipotalámicos, dicho receptor se expresa también en una gran variedad de tejidos periféricos tales como hígado, músculo, adiposo o las células β del páncreas, lo que sugiere que la leptina puede ejercer efectos directos sobre dichos tejidos, independientemente de sus efectos centrales (36). De hecho, dichos efectos directos han podido ser observados en hígado (41), en donde la leptina inhibe la síntesis de triglicéridos, y en los músculos cardíaco y esquelético, en los que promueve la oxidación de ácidos grasos (42,43), todo lo cual contribuye al mantenimiento de su sensibilidad a la insulina.

El tejido adiposo blanco, sin embargo, parece responder a la presencia de leptina de un modo opuesto a otros tejidos. De hecho, en experimentos llevados a cabo con adipocitos aislados sometidos a preincubación con altas concentraciones de leptina, se ha podido observar que la estimulación por insulina de la mayor parte de sus efectos metabólicos se encuentra marcadamente disminuida (44).

Teniendo en cuenta que a los 24 meses de edad la rata Wistar muestra resistencia central a la leptina resulta difícil postular que el mantenimiento del estado de resistencia a insulina del tejido adiposo sea debido a dicha acción central de leptina. Por otro lado, a los 24 meses de edad la concentración de leptina en sangre es unas 5 veces superior a la observada en animales jóvenes, y es probable que la concentración en la zona

adyacente a los adipocitos sea incluso muy superior (45). Por consiguiente, existe la posibilidad de que la resistencia a insulina del adipocito a la edad de 24 meses se mantenga como consecuencia de la acción directa sobre la célula adiposa de las elevadas concentraciones de leptina. Con el fin de comprobar si la leptina inhibe la señal de insulina adipocitaria actuando directamente sobre el adipocito, se incubaron durante períodos de 6 horas adipocitos aislados con concentraciones elevadas de leptina. Posteriormente se sometieron los adipocitos a estimulación con insulina y se analizó el efecto hormonal sobre diferentes pasos de su vía de señalización tales como la actividad MAP quinasa, la fosforilación de GSK3, o la autofosforilación del receptor de insulina.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la preincubación de los adipocitos durante 6 horas con leptina 50 nM inhibe por completo la estimulación por insulina de la actividad MAP quinasa. Del mismo modo, la estimulación por insulina de la fosforilación de GSK3 disminuye acusadamente en los adipocitos preincubados con leptina (40). Sin embargo, cuando la estimulación de los adipocitos se realiza con ortovanadato sódico, un agente que mimetiza la acción de la insulina sin estimular la fosforilación del receptor (46), no se observan diferencias entre las células incubadas en presencia o en ausencia de leptina en lo que a fosforilación de GSK3 o estimulación de MAP quinasa se refiere. Estos datos sugieren que la leptina inhibe la señal de insulina interfiriendo con algún paso temprano de la misma como puede ser la propia autofosforilación del receptor. El análisis de la fosforilación en tirosina del receptor de insulina muestra que la insulina 16 nM estimula algo más de 4 veces dicha fosforilación en adipocitos preincubados en ausencia de leptina, mientras que en células tratadas durante 6 horas con leptina 50 nM el efecto estimulador es inferior a 2 veces.

Los datos anteriores establecen claramente que la leptina, a elevadas concentraciones, puede inhibir la señal de insulina a nivel de la autofosforilación del receptor hormonal, lo que induce a su vez una inhibición de la transmisión de la señal a las dos ramas principales de su vía de señalización, representadas en estos estudios por la fosforilación de la GSK3 y la activación de MAP quinasa. Es sabido que la leptina induce la expresión de SOCS-3 tanto en núcleos hipotalámicos como en líneas celulares (30,47,48), lo que permite la terminación de su señal. Por otro lado, se ha demostrado también que SOCS-3 inhibe la señal de insulina en diferentes líneas celulares (49-51). Aunque se han propuesto diferentes mecanismos moleculares para dicha inhibición, en células HepG2 se ha observado la asociación directa de SOCS-3 con el receptor de insulina la cual causa la inhibición de la autofosforilación del mismo (51). Nuestros

datos permiten sugerir que la incubación de los adipocitos con elevadas concentraciones de leptina puede dar lugar a una elevación del nivel de SOCS-3 en la célula adiposa que tenga como consecuencia la inhibición de la fosforilación del receptor de insulina y el bloqueo de la señal hormonal. El estudio de los niveles de SOCS-3 en adipocitos aislados demuestra que la incubación con leptina 50 nM durante 6 horas induce un incremento del 150% en la cantidad de SOCS-3 (40). Aunque no se ha podido demostrar la existencia de una asociación directa entre SOCS-3 y el receptor de insulina en adipocitos, los datos anteriores apoyan la idea de la implicación de SOCS-3 en el mecanismo molecular por el que la leptina inhibe la señal de insulina en el adipocito. Un dato relevante en esta misma línea es el incremento en la expresión de SOCS-3 observado en el tejido adiposo de ratas de 24 meses de edad (40) que sugiere que la hiperleptinemia prolongada podría inducir la inhibición de la señal de insulina en tejido adiposo mediante un mecanismo igual al observado en los experimentos in vitro. De hecho, el incremento de la expresión de SOCS-3 en tejido adiposo se observa ya a los 8 meses de edad, cuando la concentración de leptina en sangre sólo ha experimentado un crecimiento moderado.

El incremento en la expresión de SOCS-3 en tejido adiposo con la edad puede ser indicativo de la presencia de resistencia a la leptina en dicho tejido. Nuestros datos indican que a lo largo de la vida, y en concreto entre los 3 y los 8 meses de edad, se produce un aumento importante del porcentaje de grasa visceral. Ello conlleva un aumento en la concentración de leptina en sangre y, probablemente, una señal central de leptina incrementada que debería ejercer un efecto lipopénico. El hecho de que la adiposidad aumente y luego se mantenga sólo será posible si de algún modo el tejido adiposo bloquea su autosupresión, proceso en el cual un incremento en el nivel celular de SOCS-3 puede desempeñar un papel importante. Este incremento en el nivel adipocitario de SOCS-3 ha sido puesto de manifiesto en situaciones de obesidad asociadas también a hiperleptinemia (45). Resulta interesante señalar que la restricción calórica en ratas de 24 meses de edad, además de revertir la resistencia central a la leptina, lleva aparejada una disminución en la expresión de SOCS-3 en el tejido adiposo y la subsiguiente mejora en la estimulación por insulina de la autofosforilación del receptor y de la actividad MAP quinasa. Sin embargo, la estimulación por insulina de la fosforilación de GSK3 no se ve incrementada después de la restricción calórica lo que hace suponer que la hiperleptinemia prolongada, u otros factores asociados a la adiposidad elevada, inducen alguna alteración en la vía de señalización de la insulina

que lleva hasta la fosforilación de GSK3, que no es reversible por la restricción calórica. Esto podría explicar la aparente discrepancia entre los efectos de la restricción calórica sobre la acción central de leptina y la estimulación por insulina de su receptor en adipocitos aislados, y su incapacidad para incrementar la captura de glucosa por parte del tejido adiposo blanco en condiciones de anclaje euglicémico-hiperinsulinémico en animales de 24 meses de edad.

Conclusiones finales

La rata Wistar constituye un buen modelo experimental para el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina con la edad dado que mantiene la normogluceemia y la normoinsulinemia hasta la edad de 24 meses, permitiendo detectar alteraciones primarias asociadas al envejecimiento no derivadas de cambios previos en la homeostasis de glucosa. Los estudios llevados a cabo utilizando este modelo han puesto de manifiesto que la resistencia a la insulina ya se puede observar a la edad de 8 meses a nivel del organismo entero, aunque la tolerancia a la glucosa se mantiene hasta la edad de 24 meses gracias a una hipersecreción compensatoria de insulina. El tejido adiposo parece ser el primero en manifestar dicha resistencia a insulina tal como se ha observado tanto en estudios in vivo como con adipocitos aislados. Por el contrario, el tejido muscular desarrolla resistencia a la insulina con posterioridad, y no todos los músculos diana de la insulina se encuentran afectados.

Aunque la rata Wistar experimenta un aumento constante de peso hasta la edad de 24 meses, entre los 3 y los 8 meses de edad se produce un incremento de la grasa visceral muy significativo, para posteriormente aumentar sólo en la misma proporción que el peso corporal (Ver Figura 1). Resulta difícil explicar las causas de este incremento en el porcentaje de grasa visceral. Una posibilidad reside en el desarrollo de resistencia hipotalámica a la leptina que de algún modo induciría el incremento de la masa grasa con objeto de atender a la demanda de una mayor cantidad de leptina. La concentración de leptina en sangre aumenta a los 8 meses de edad. Sin embargo, aunque no se ha estudiado la respuesta central a la misma en ratas de 8 meses, resulta improbable que exista resistencia central a la leptina habida cuenta de que tanto el nivel hipotalámico de receptor OB-Rb como el de SOCS-3 permanecen invariables a dicha edad. No obstante, el nivel de expresión de SOCS-3 en tejido adiposo se encuentra incrementado a los 8 meses de edad. Esto puede representar un mecanismo que impida

el efecto lipopénico de la leptina circulante, pero podría limitar también la acción lipopénica central de la leptina. En cualquier caso, el resultado es la inhibición de la señal insulínica, en parte como consecuencia del aumento de SOCS-3, y en parte debido a una mayor acción central de la leptina como consecuencia del incremento de su concentración en sangre.

La persistencia de esta situación conlleva a largo plazo el desarrollo de resistencia central a leptina y un mayor incremento de su nivel circulante que es suficiente para mantener elevado el nivel de SOCS-3 en tejido adiposo. Esto, además de bloquear el efecto supresor de leptina sobre el tejido adiposo, contribuye a mantener el estado de resistencia a insulina. La resistencia a insulina prolongada induce probablemente la resistencia en otros tejidos musculares, agravando la situación.

Un comentario aparte merece el efecto de la restricción calórica. Si el incremento de la grasa visceral se limita desde una edad temprana, a los 8 meses se observa una concentración de leptina en sangre inferior a la presente en animales de 3 meses. Esto permite que el tejido adiposo presente una sensibilidad a insulina normal ya que no hay incremento en el nivel adipocitario de SOCS-3 ni un aumento de la señal central de leptina. Además, los niveles en sangre de adiponectina se ven incrementados. Por el contrario, cuando la restricción calórica se inicia a una edad avanzada, después de un largo período de hiperleptinemia, aunque se produce una disminución muy significativa de la adiposidad visceral (porcentualmente es idéntica a la observada en ratas de 8 meses después de la restricción calórica), la concentración de leptina en sangre se mantiene ligeramente por encima del valor normal observado en animales de 8 meses de edad. Aunque el nivel de SOCS-3 en tejido adiposo disminuye y permite que la insulina estimule tanto su receptor como la vía de señalización mitogénica que conduce a MAP quinasa, la acción central de leptina se ve recuperada lo que podría ser causa del mantenimiento de la inhibición de la señal metabólica de insulina, que conduce a la estimulación de la captura de glucosa. Alternativamente, puede pensarse que la hiperleptinemia prolongada ha provocado algún tipo de daño permanente en pasos tardíos de la vía de señalización, que no es sensible a la restricción calórica. En este sentido conviene señalar la incapacidad de la restricción calórica para provocar un aumento de la concentración plasmática de adiponectina en las ratas de 24 meses de edad.

En resumen, los datos obtenidos permiten postular que las adipoquinas, y en concreto la leptina, parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo de la resistencia a insulina durante el envejecimiento.

Agradecimientos

Los datos aquí presentados son el resultado de un trabajo en colaboración entre el grupo dirigido por el Dr. Antonio Andrés, de la Universidad de Castilla La Mancha en Ciudad Real, el grupo del Dr. Manuel Ros, de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, y el del propio autor. A ambos, así como a todos los colaboradores, Carmen Arribas, Carmen Martínez, Nilda Gallardo, Teresa Fernández-Agulló, Coralía Pérez, Juan Carlos Molero, Yasmín Fermín y Susana Peralta, quiero expresarles mi reconocimiento. Quiero expresar también mi agradecimiento al Dr. Fernando Escrivá de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los estudios en condiciones de anclaje euglicémico. Las investigaciones aquí reseñadas han sido realizadas en el marco de diversos proyectos financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, la Comunidad Autónoma de Madrid y la Junta de Castilla La Mancha. El Centro de Biología Molecular es beneficiario de una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFIA

1. Davidson MD (1979) The effect of aging on carbohydrate metabolism. A review of the english literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly. *Metabolism* 28: 688-705
2. De Fronzo RA (1981) Glucose intolerance and aging. *Diabetes Care* 4: 493-501
3. Fink RI, Kolterman OG, Griffin J, Olefsky JM (1983) Mechanisms of insulin resistance in aging. *J. Clin. Invest.* 71: 1523-1535
4. Rowe JW, Minaker KL, Pallota JA, Flier JS (1983) Characterization of the insulin resistance of aging. *J. Clin. Invest.* 71: 1581-1587
5. Ferrannini E, Vichi S, Beck-Nielsen H, Laakso M, Paolisso G, Smith U, European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) (1996) Insulin action and age. *Diabetes* 45:947-953
6. Basu R, Breda E, Oberg AL, Powell CC, Dalla Man C, Basu A, Vittone JL, Klee GG, Arora P, Jensen MD, Toffolo G, Cobelli C, Rizza RA (2003) Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance. *Diabetes* 52:1738-1748
7. Nishimura H, Kuzuya H, Okamoto M, Yoshimasa Y, Yamada K, Ida T, Kakehi T, Imura H (1988) Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 254: E92-E98.
8. Escriva F, Agote M, Rubio E, Molero JC, Pascual-Leone AM, Andrés A, Satrústegui J, Carrascosa JM (1997) *In vivo* insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. *Endocrinology* 138: 49-54
9. Goodman MN, Dluz SM, McElaney MA, Belur E, Ruderman NB (1983) Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: changes during 3-96 weeks of age. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 244: E93-E100
10. Narimiya M, Azhar S, Dulkas CB, Mondon CE, Sims C, Wright DW, Reaven GM (1984) Insulin resistance in older rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 246: E397-E404
11. Barzilai N, Rossetti L (1995) Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat. *Am. J. Physiol.* 269: E591-E597

12. Fink RI, Huecksteadt T, Karaoghlanian Z (1986) The effects of aging on glucose metabolism in adipocytes from Fischer rats. *Endocrinology* 118: 1139-1147
13. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N (2002) Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging. *Diabetes* 51: 2951-2958
14. Smith U (2002) Impaired ("diabetic") insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance: is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *Int. J. Obes.* 26: 897-904
15. Chandran M, Philips SA, Ciaraldi T, Henry RR (2003) Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26: 2442-2450
16. Ahima RS, Flier JS (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.* 11: 327-332
17. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol.* 280: E827-E847
18. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432
19. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271
20. Porte D Jr, Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW (1998) Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* 41: 863-881
21. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671
22. Cummings DE, Schwartz MW (2003) Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu. Rev. Med.* 54: 453-471
23. Harvey J, Ashford ML (2003) Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* 44: 845-854

24. Niswender KD, Schwartz MW (2003) Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front. Neuroendocrinol.* 24: 1-10
25. Tritos NA, Mantzoros CS (1997) Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia* 40: 1371-1379
26. Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770
27. Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Pérez C, Peralta S, Arribas C, Andrés A, Carrascosa JM, Ros M (2002) Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia* 45: 997-1003
28. Bjorbaek C, Uotani S, Da Silva B, Flier JS (1997) Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 32686-32695
29. Ghilardi N, Skoda RC (1997) The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol. Endocrinol.* 11: 393-399
30. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 14563-14572
31. Peralta S, Carrascosa JM, Gallardo N, Ros M, Arribas C (2002) Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects of food restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 425-428
32. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the *obese* gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* 269: 540-543
33. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the *obese* gene. *Science* 269: 543-546
34. Shimomura L, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL (1999) Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401: 73-76
35. Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, De Paoli AM, Taylor SI, Gorden P, Shulman GI (2002) Leptin reverses insulin

- resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* 109: 1345-1350
36. Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G (2002) Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J.* 16: 1163-1176
 37. Minokoshi Y, Haque MS, Shimazu T (1999) Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* 48: 287-291
 38. Wang JL, Chinokoswong N, Scully S, Qui M, Shi ZQ (1999) Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization in vivo. *Endocrinology* 140: 2117-2124
 39. Rouru J, Cusin I, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F (1999) Effects of intravenously infused leptin on insulin sensitivity and on the expression of uncoupling proteins in brown adipose tissue. *Endocrinology* 140: 3688-3692
 40. Pérez C, Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Arribas C, Andrés A, Ros M, Carrascosa JM (2004) Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53: 347-353
 41. Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, Higa M, Zhou YT, Unger RH (2001) Liporegulation in diet induced obesity: the antisteatotic role of hyperleptinemia. *J. Biol. Chem.* 276: 5629-5635
 42. Atkinson LL, Fischer MA, Lopaschuk GD (2002) Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase: acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. *J. Biol. Chem.* 277: 29424-29430
 43. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, Kahn BB (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-343
 44. Müller G, Ertl J, Gerl M, Preibish G (1997) Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 10585-10593
 45. Wang Z, Zhou YT, Kakuma T, Lee Y, Kalra SP, Kalra PS, Pan W, Unger RH (2000) Leptin resistance of adipocytes in obesity: role of suppressors of cytokine signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 20-26
 46. Molero JC, Martínez C, Andrés A, Satrústegui J, Carrascosa JM (1998) Vanadate fully stimulates insulin receptor substrate-1 associated phosphatidyl

- inositol 3-kinase activity in adipocytes from young and old rats. *FEBS Letters* 425: 298-304
47. Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS (1998) Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* 1: 619-625
 48. Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS (1999) The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J. Biol. Chem.* 274: 30059-30065
 49. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E (2001) SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. *J. Biol. Chem.* 276: 47944-47949
 50. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson SE, White MF (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* 277: 42394-42398
 51. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmer TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA (2003) Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3): A potential mediator of interleukin-6 dependent insulin resistance in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 278: 13740-13746
 52. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tümer S, Scarpace PJ (1997) Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes* 46: 2035-2039

Tabla 1.- Características de los animales

Edad	3 meses	8 meses	8 meses – Restricción calórica	24 meses	24 meses- Restricción calórica
Peso corporal (g)	438 ± 17	562 ± 21 ^a	422 ± 9 ^c	778 ± 22 ^{a,b}	607 ± 13 ^c
Glucosa en sangre (mg/dl)	123 ± 4	131 ± 5	109 ± 4	126 ± 4	125 ± 4
Insulina en suero (ng/ml)	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,67 ± 0,03 ^c	1,27 ± 0,28	1,09 ± 0,03
Leptina en suero (ng/ml)	4,6 ± 0,5	7,5 ± 0,9 ^a	2,0 ± 0,1 ^c	27,6 ± 4,0 ^{a,b}	7,1 ± 1,2 ^c
Adiponectina en suero (µg/ml)	3,1 ± 0,2	2,5 ± 0,2	4,1 ± 0,3 ^c	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,2
Índice de Lee	311 ± 3	315 ± 4	297 ± 3 ^c	319 ± 3	302 ± 4 ^c
Índice de adiposidad (%)	3,1 ± 0,1	5,3 ± 0,3 ^a	1,4 ± 0,06 ^c	5,2 ± 0,4 ^a	1,8 ± 0,1 ^c
Test de Tolerancia Oral a la Glucosa:					
Area bajo la curva de glucosa (mM x min)	429,9 ± 50,0	396,9 ± 32,2	363,5 ± 44,4	429,3 ± 77,7	500,0 ± 50,0
Area bajo la curva de insulina (nM x min)	4,8 ± 1,1	13,8 ± 2,1 ^a	2,4 ± 0,3 ^c	27,6 ± 4,0 ^{a,b}	25,4 ± 4,3
Índice de sensibilidad a insulina	91,6 ± 13,0	28,0 ± 2,6 ^a	205,3 ± 35,0 ^c	18,6 ± 3,0 ^{a,b}	22,9 ± 3,3
Anclaje euglicémico: Consumo de glucosa (µmol x min⁻¹ x kg⁻¹)					
Insulina 2 nmol x h ⁻¹ x kg ⁻¹	86,6 ± 2,8	78,3 ± 7,2	106,7 ± 9,4 ^c	62,8 ± 2,8 ^{a,b}	88,3 ± 3,9 ^c
Insulina 4 nmol x h ⁻¹ x kg ⁻¹	117,8 ± 5,5	89,4 ± 3,3 ^a	130,5 ± 5,5 ^c	81,1 ± 6,7 ^a	91,7 ± 5,0

El Índice de Obesidad de Lee se calculó mediante la expresión $10^4 \times \sqrt[3]{\text{Peso corporal (g)} \times \text{longitud naso-anal (mm)}^{-1}}$, según lo descrito en (52).

El Índice de sensibilidad a insulina es el cociente entre las áreas bajo la curva de glucosa e insulina.

Las comparaciones entre grupos de distinta edad se efectuaron mediante ANOVA, y para grupos de la misma edad sometidos o no a restricción nutricional se empleó la *t* de Student. a) $p < 0,05$ versus 3 meses; b) $p < 0,05$ versus 8 meses; c) $p < 0,05$ versus igual edad alimentados *ad libitum*.

Tabla 2.- Captura de glucosa por diferentes tejidos en condiciones de anclaje euglicémico

Tejido	Edad (meses)	Velocidad de infusión de insulina (nmol · h ⁻¹ · kg ⁻¹)		
		0	2	4
Tejido adiposo blanco retroperitoneal	3	2,8 ± 0,5	16,7 ± 2,2 ^a (6,0)	13,9 ± 1,1 ^a (5,0)
	8	2,8 ± 0,5	10,0 ± 2,2 ^{a,c} (3,6)	8,9 ± 1,1 ^{a,c} (3,2)
	8-RC	3,9 ± 0,5	27,2 ± 4,4 ^{a,e} (7,0)	25,0 ± 4,4 ^{a,e} (6,4)
	24	4,4 ± 0,5	1,7 ± 2,8 (2,6)	10,0 ± 0,5 ^c (2,25)
	24-RC	4,4 ± 0,5	1,9 ± 1,1 ^a (3,1)	10,0 ± 0,5 ^a (2,25)
Tejido adiposo blanco epididimal	3	3,9 ± 0,5	10,5 ± 1,7 ^a (2,7)	11,7 ± 1,7 ^a (3,0)
	8	3,3 ± 0,5	6,7 ± 1,1 ^a (2,0)	6,1 ± 0,5 ^c (1,8)
	8-RC	3,9 ± 0,5	17,2 ± 0,5 ^{a,e} (4,4)	17,8 ± 5,0 ^{a,e} (4,6)
	24	6,1 ± 1,1	8,3 ± 1,1 (1,4)	7,2 ± 1,1 ^c (1,2)
	24-RC	3,9 ± 0,5	8,3 ± 0,5 ^a (2,1)	6,1 ± 1,1 (1,6)
Soleus	3	15,6 ± 0,5	43,3 ± 5,0 ^a (2,8)	76,7 ± 3,9 ^{a,b} (4,9)
	8	18,9 ± 1,7	57,8 ± 6,7 ^a (3,05)	68,9 ± 15,5 ^a (3,6)
	8-RC	10,0 ± 1,7	81,1 ± 16,1 ^a (8,1)	74,4 ± 10,5 ^a (7,4)
	24	16,1 ± 2,2	27,8 ± 3,3 ^{a,c,d} (1,7)	50,5 ± 5,0 ^{a,c} (3,1)
	24-RC	13,9 ± 1,1	48,9 ± 6,1 ^{a,c} (3,5)	49,4 ± 6,1 ^a (3,6)
Diafragma	3	75,5 ± 11,1	281,1 ± 38,3 ^a (3,7)	372,2 ± 31,1 ^{a,b} (4,9)
	8	77,2 ± 11,1	227,2 ± 28,9 ^a (2,9)	312,2 ± 53,3 ^a (4,0)
	8-RC	48,3 ± 10,0	356,1 ± 27,8 ^{a,c} (7,4)	302,8 ± 61,1 ^a (6,3)
	24	105,0 ± 28,3	167,8 ± 17,2 ^{a,c} (1,6)	228,3 ± 16,7 ^{a,b,c} (2,2)
	24-RC	49,4 ± 8,9	245,5 ± 40,5 ^a (5,0)	221,7 ± 33,3 ^a (4,5)
Corazón	3	28,3 ± 1,7	372,8 ± 35,5 ^a (13,2)	491,7 ± 43,3 ^{a,b} (17,3)
	8	63,9 ± 17,8	317,2 ± 52,8 ^a (5,0)	300,5 ± 22,2 ^{a,c} (4,7)
	8-RC	45,0 ± 16,1	429,4 ± 115,0 ^a (9,5)	320,5 ± 63,3 ^a (7,1)
	24	123,9 ± 48,9 ^e	352,8 ± 22,8 ^a (2,8)	386,1 ± 38,3 ^{a,c} (3,1)
	24-RC	45,0 ± 10,5	387,2 ± 98,9 ^a (8,6)	352,2 ± 76,7 ^a (7,8)

Los datos se expresan en μmol de glucosa $\times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$. Las veces de estimulación se indican entre paréntesis. a) $p < 0,05$ versus basal; b) $p < 0,05$ versus 2 $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$; c) $p < 0,05$ versus 3 meses; d) $p < 0,05$ versus 8 meses; e) $p < 0,05$ versus misma edad alimentado *ad libitum*. RC, restricción calórica

Figura 1.- Influencia de la edad y la restricción calórica en la evolución de la resistencia a insulina y otros parámetros asociados a la misma.

