

ARTÍCULO ORIGINAL

Glucemia y concentraciones de insulina en sangre de ratas Wistar sometidas a dieta alta en grasa y a tratamiento con péptidos miméticos de leptina

Elpidia Poveda¹, Pilar Trujillo², Francisco Ruiz³, Elizabeth López⁴

¹ Grupo de Nutrición, Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Nutrición y Bioquímica, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

³ Bioterio, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Grupo de Sociedad y Salud, Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La administración de leptina ha demostrado que revierte la resistencia a la insulina y ejerce efectos sobre el metabolismo de la glucosa.

Objetivo. Evaluar los cambios en las concentraciones plasmáticas de insulina y glucosa por la administración intraperitoneal de péptidos miméticos de leptina en ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasa.

Materiales y métodos. Se definió un grupo de ratas control alimentado con dieta alta en grasa y un grupo control con dieta normal; además, distintos grupos de animales alimentados con dieta alta en grasa y sometidos a la administración de siete diferentes péptidos de leptina, administrados en cuatro concentraciones diferentes y a los cuales se denominó grupos tratamiento. Durante la administración de los péptidos se cuantificó la glucemia y al finalizar las concentraciones de insulina.

Resultados. Las concentraciones de insulina en los grupos fueron similares; se observó hiperinsulinemia en los grupos a los cuales se les administró el péptido denominado 83 a dosis de 10 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal. Todos los tratamientos, a excepción del grupo al cual se le administró el péptido denominado con el código 80, redujeron la glucemia; el mayor efecto parece ser el del péptido 116-130 de leptina de ratón y su homólogo humano, aunque sin diferencias estadísticas con los otros tratamientos.

Conclusión. Los péptidos no ejercen efectos sobre las concentraciones de insulina pero sí sobre la glucemia; se requieren otras investigaciones para determinar los mecanismos mediante los cuales los péptidos intervienen en el metabolismo de la glucosa, sobre la expresión, secreción, mecanismos de señalización y regulación de la insulina, además, cambios en las concentraciones de insulina teniendo en cuenta el ritmo pulsátil de la hormona.

Palabras clave: glucosa de la sangre, insulina, grasas en la dieta, péptidos, leptina, ratas Wistar.

Glucose and insulin levels in Wistar rats submitted to high fat diet and treatment with mimetic leptin peptides

Introduction. Studies on leptin administration have demonstrated a reversion of insulin resistance, and that leptin produces effects in glucose metabolism.

Objective. Changes in the insulin and glucose concentrations in blood plasma was evaluated by intraperitoneal administration of mimetic leptin peptides in Wistar rats fed with high fat diet.

Materials and methods. A control group of rats was defined that were fed with high fat diet and a control group with normal diet. Several treatment groups were fed with high fat diet and subjected to the administration of seven different mimetic leptin peptides, each one administered in four different concentrations. During the peptide administration the glucose concentrations were quantified and at the end the insulin concentrations.

Results. The average insulin concentrations in the control groups were similar; however, hyperinsulinemia was observed in the groups to which we administered the peptide

denominated 83 at doses of 10 mg/kg and 20 mg/kg of body weight. All the treatment groups except the peptide denominated with the code 80 showed diminished glucose levels even in the cases without hyperglycemia. The greatest effect was observed with the peptide 116-130 of the mouse leptin and its human homolog, although without statistical differences with the other treatments.

Conclusion. Lectin peptides have no effect on the insulin plasma concentrations; however, an effect is evident in glucose levels. Additional research will be required to determine if leptin mimetic peptides influence the glucose metabolism or the expression, secretion, signaling mechanism and regulation of insulin.

Key words: blood glucose, insulin, dietary fats, peptides, leptin, rats, Wistar.

La leptina, producto del gen *ob*, es una hormona proteica de 167 aminoácidos perteneciente a la familia de citocinas, que es secretada principalmente por el adipocito de tejido adiposo blanco (1-5). Es una proteína reguladora de varios procesos fisiológicos, entre ellos, controlar la masa corporal grasa por vía de efectos en el apetito, el metabolismo energético y la termogénesis (1,6). Inicialmente, se pensó que la habilidad para regular el apetito y el peso corporal estaba confinada a una acción hipotalámica, pero estudios posteriores indicaron una acción en otras regiones del sistema nervioso central y, además, una acción autocrina paracrina (7-15).

Los estudios en ratones *knock out* para el gen de leptina demostraron una asociación entre leptina, obesidad y otras secuelas metabólicas, tales como hiperfagia e hiperglucemia (16,17); posteriormente, se realizaron diversos estudios que, además de asociarla con obesidad tanto en humanos como en ratas, la relacionan con cambios en las concentraciones y expresión de la insulina, lo cual podría explicar la fisiología y patología de la diabetes mellitus no insulino dependiente en la obesidad (18-35); algunos de estos estudios sustentan sus conclusiones en lo siguiente:

- 1) Durante la pérdida de peso se observan disminuciones en la leptina con reducción en

las concentraciones de insulina e independientemente de los cambios de adiposidad (21,26).

- 2) En las células B pancreáticas, la leptina parece suprimir la secreción de insulina a través de la activación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B), inhibiendo la secreción del péptido 1 como glucagón estimulante de insulina (29).
- 3) En células Fao, la leptina incrementa la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) y la actividad de P13K, mientras inhibe la vía de señalización del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS-2) (30).
- 4) En las ratas Wistar con concentraciones plasmáticas elevadas de leptina se inhibe la señalización ejercida por la insulina en el adipocito al dañar el proceso de autofosforilación de su receptor, lo anterior parece estar relacionado con el incremento en la expresión de la proteína SOCS-3 (31).

Se encuentran otros reportes en los cuales se menciona que es la insulina la que influye en la expresión y en las concentraciones de leptina (36,37) y otros que no indican relación alguna entre insulina y leptina (38).

Los investigadores que indican un efecto de la insulina sobre la leptina proponen como soporte los siguientes aspectos: 1) se menciona que en la resistencia a la insulina las concentraciones de leptina son elevadas independientemente del grado de adiposidad (25); 2) en los estudios *in vitro* de adipocitos, la insulina estimula la expresión y secreción de la leptina; uno de los pasos para este estímulo parece ser la activación de la fosfodiesterasa III por la insulina, la norepinefrina y otras hormonas lipolíticas que

Correspondencia:

Elpidia Poveda, Grupo de Nutrición, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, zona 6 CAN, Bogotá. D.C., Colombia.
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 303, fax: (571) 220 7700, extensión 255.
epoveda@ins.gov.co, epoveda1@yahoo.com

Recibido:29/12/06; aceptado: 04/10/07

competitivamente parecen coregular el efecto que ejerce la insulina sobre la leptina por activación del sistema adenilato-ciclasa (5,28,36).

Aunque parece no existir claridad sobre la complejidad de la relación entre leptina e insulina se han evaluado los efectos sobre la glucemia y la insulina debidas a la administración de leptina recombinante. En ratas Wistar sometidas a una dieta alta en grasa por 12 semanas, se revirtió el estado de resistencia a la insulina por la administración de leptina durante 12 días a una dosis diaria de 10 mg/kg, normalizando la concentración del transportador de glucosa 4, GLUT-4, y sin comprometer la secreción de insulina (26,30). Las infusiones cerebrales de leptina han incrementado la sensibilidad a la insulina en condiciones basales de ayuno y han aumentado la sensibilidad a la insulina en ratas sujetas a hiperinsulinemia por consumo constante de glucosa (32).

Los tratamientos crónicos de leptina también han incrementado el metabolismo de la glucosa, independientemente de las concentraciones plasmáticas de insulina; el efecto parece estar mediado por el sistema nervioso central, mediante la interacción de la leptina con su receptor (39,40).

Las respuestas por el uso de leptina recombinante han generado la expectativa por descubrir métodos de tratamiento más eficientes para la obesidad y las secuelas metabólicas asociadas. Inicialmente se exploró la utilización del péptido sintético correspondiente al segmento 116-130 de leptina de ratón en ratones obesos *knock out* (ob/ob), y se obtuvieron respuestas de reducción de peso, disminución del apetito y de la glucemia (16,17). Posteriormente, se ensayó en ratones ob/ob un péptido sintético correspondiente a la secuencia 116-122 de leptina de ratón pero en el cual se sustituyó la forma L-aminoácido de la posición 119 por la de D-aminoácido; se encontró una mayor actividad que en el péptido nativo no modificado 116-130 de leptina de ratón para reducir peso corporal, apetito y glucemia (41).

Teniendo en cuenta los hallazgos previos sobre el potencial de la leptina y de los péptidos de leptina para el tratamiento de la obesidad y de otras alteraciones metabólicas, se decidió indagar

si los péptidos miméticos de leptina podrían tener algún efecto biológico sobre los procesos relacionados con el metabolismo energético. En el presente estudio se evaluó si existían cambios en la glucemia y en las concentraciones de insulina de ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasa por la administración de péptidos miméticos de leptina por vía intraperitoneal. Un grupo de ratas fueron tratadas con el péptido que conserva la secuencia del segmento 116-130 de leptina de ratón (16), otro grupo con el péptido humano similar al 116-130 de leptina de ratón y que corresponde a la secuencia 95-109 de la proteína 1AX8 (código en el *Protein Data Bank* para la leptina humana) y otros grupos de ratas se trataron con distintos péptidos miméticos de leptina previamente diseñados por computador (42).

Materiales y métodos

Péptidos

Antecedentes del diseño teórico de los péptidos miméticos de leptina. En el diseño teórico de los péptidos miméticos de leptina se construyó un modelo de estructura tridimensional del segmento 323-640 del receptor hipotalámico de leptina que corresponde al sitio activo del receptor (43); se hicieron cambios puntuales en la secuencia de aminoácidos del segmento de leptina humana 95-109, y se simuló la interacción entre cada péptido con el modelo del sitio activo del receptor. Luego de esto, se seleccionaron aquellos péptidos teóricos con menor energía potencial que el péptido nativo 116-130 de leptina de ratón que cumplieran con un valor promedio de la raíz cuadrada de la media, inferior a 0,09 con respecto a la secuencia nativa, en este caso, con respecto a la secuencia 116-130 de leptina de ratón; además, que cumplieran con el criterio de los valores más bajos de energía potencial cuando formaran parte del complejo péptido-sitio activo del receptor. De estos criterios se seleccionaron finalmente cinco péptidos (42). El valor del promedio de la raíz cuadrada de la media es una relación matemática que indica el cambio en una estructura proteica modificada con respecto a la estructura proteica original; se define como el cuadrado del promedio de la desviación al cuadrado de la posición.

Cuadro 1. Secuencias de los péptidos correspondientes al segmento de aminoácidos de las posiciones 116-130 de leptina de ratón, el péptido similar al 116-130 de leptina de ratón en la leptina humana (corresponde a la proteína leptina humana 1AX8 en el *Protein Data Bank*) y de los cinco péptidos miméticos.

Péptido	Código	Secuencia
Lep- (116-130)	78	SCSLPQTSGLQKPES
Péptido humano similar al 116-130	79	SCHLPEASGLETLDLDS
Péptido mimético de leptina	80	SCHLPEASDLETLDLDS
Péptido mimético de leptina	81	GCHLPEASGLETLDLDS
Péptido mimético de leptina	82	DCHLPEASGLETLDLDS
Péptido mimético de leptina	83	MCHLPEASGLETLDLDS
Péptido mimético de leptina	84	CCHLPEASGLETLDLDS

Síntesis de péptidos. Se sintetizaron el péptido que conserva la secuencia nativa del péptido 116-130 de leptina de ratón descrito por Patricia Grasso *et al.* como el péptido activo de leptina (16), el péptido correspondiente a las posiciones 95-109 de la proteína identificada en el PDB como 1AX8 o péptido humano similar al 116-130 de ratón y los cinco péptidos miméticos de leptina diseñados previamente por computador (42). La síntesis de los péptidos se llevó a cabo en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia quienes realizaron el proceso de síntesis por el método de fase sólida, purificación y caracterización por RP-HPLC y liofilizados (44-47). El péptido 116-130 de leptina de ratón se reconoce en el estudio con el código 78, el péptido humano similar al 116-130 de ratón con el código 79 y los péptidos miméticos de leptina con los códigos 80, 81, 82, 83 y 84. En el cuadro 1 se describen las secuencias correspondientes a cada uno de los péptidos.

Animales y dieta

Se utilizó un modelo animal con 180 ratas Wistar hembra de nueve semanas de edad. En las semanas uno, los animales de nueve semanas de edad se colocaron en cajas individuales y se mantuvieron en el Bioterio del Instituto Nacional de Salud bajo condiciones de humedad, luz y temperatura controladas (humedad, 60±10%; temperatura 23±1 °C, y periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Las ratas se mantuvieron sin realizar procedimientos por siete días para lograr aclimatación, y se les permitió el consumo de agua y alimento a libre demanda. Todos los grupos recibieron en este periodo el

concentrado comercial para animales de laboratorio Rodentina Purina® con 10% de la composición en grasa.

Después del periodo de aclimatación, los animales se separaron en un grupo control de seis animales alimentado con dieta normal, un grupo control también de seis animales pero alimentado con dieta alta en grasa y varios grupos de tratamiento alimentados con dieta alta en grasa pero sometidos posteriormente a la administración de los diferentes péptidos; de esta forma, el grupo denominado tratamiento se conformó por 28 subgrupos, cada uno de seis animales, de acuerdo con los siete péptidos por evaluar (cinco péptidos miméticos de leptina, el péptido 116-130 de leptina de ratón y el péptido humano con secuencia similar al 116-130 de leptina de ratón) y a las cuatro dosis en que se decidió administrar cada uno de los siete péptidos (2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg de peso). Todos los grupos de seis animales se distribuyeron aleatoriamente de forma que los pesos entre ellos no presentaran una diferencia mayor a una desviación estándar.

Por 15 semanas el grupo control normal recibió una dieta que proporcionó la cantidad de grasa normal recomendada para estos animales, correspondiente al 10% del valor calórico total en grasa. El grupo control graso así como los grupos de tratamiento recibieron una dieta alta en grasa que proporcionó el 60% del valor calórico total en grasa. Ambas dietas se adquirieron en la compañía Research Diets, New Brunswick, NY, USA, donde se identifican con el código D1245OB para el caso de la dieta normal y D12492 para la dieta alta en

grasa. Las ratas consumieron el agua y el alimento a libre demanda. Para controlar el peso se realizaron pesajes semanales y durante la administración de los péptidos de forma diaria; para esto se utilizó una balanza electrónica.

Concentraciones de leptina

En la semana 13 de estar recibiendo la dieta específica se evaluaron las concentraciones de leptina. Para ello, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamine, 0,5 ml/kg, y xilasine, 1,9 ml/kg, y por punción cardiaca se extrajo 1 ml de sangre. El suero se separó por centrifugación dentro de las tres horas después de la toma de la muestra y se mantuvieron a -4 °C mientras se llevaron a congelación a -70 °C. Posteriormente, se determinaron las concentraciones séricas de leptina por ensayo de microelisa con el kit de leptina de ratón DSL-10-24100 de Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (Webster, TX, USA) y el equipo lector de ELISA BIO-RAD modelo 3550.

Administración de los péptidos

Desde la semana 10 de dieta específica, todas las ratas recibieron semanalmente solución salina por vía intraperitoneal, con el fin de adaptarlas a la punción; se realizaron en total seis punciones de 1 ml/kg.

Los péptidos se disolvieron en solución tamponada de fosfatos (PBS) a pH de 7,2 y se administraron por vía intraperitoneal al iniciar la semana quince de inducción de sobrepeso por dieta alta en grasa; la administración se hizo por cinco días consecutivos y en cuatro dosis diferentes: 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg de peso. Los grupos control recibieron durante los mismos cinco días 1 mg/kg peso por día de PBS por vía intraperitoneal.

Las dosis seleccionadas para administrar los péptidos se definieron teniendo en cuenta el criterio farmacológico que indica una relación entre dosis, producción de una respuesta e intensidad de la respuesta; a partir de este criterio se seleccionó un valor mínimo, dos intermedios y un valor alto. El valor inferior se definió teniendo como referencia algunos ensayos en los cuales se ha utilizado el péptido 116-130 de leptina de ratón a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal (16,17,19).

La administración de los péptidos se realizó dos semanas después de la determinación de las concentraciones de leptina con el fin de permitir la recuperación por el estrés que pudiera haberse generado debido al procedimiento de la toma de sangre para la determinación de las concentraciones de leptina.

Concentraciones de glucosa en sangre

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola de cada uno de los animales, las muestras se tomaron antes del periodo de oscuridad y en el día uno a cinco de la administración de los péptidos. Las concentraciones de glucosa se determinaron mediante método conductivimétrico con un glucómetro Assure II.

Concentraciones de insulina

Al día siguiente de la última administración de los péptidos, se anestesiaron los animales con una mezcla de ketamine y xilasine, 0,5 ml/kg y 1,9 ml/kg, respectivamente. Las muestras de sangre se recolectaron por punción cardiaca con jeringa desechable; se extrajo un máximo de 5 ml de sangre sin anticoagulante; posteriormente, las ratas se llevaron a la cabina de CO₂. El suero se separó por centrifugación dentro de las tres horas después de la toma de la muestra y se mantuvieron a -4 °C mientras se llevaron a congelación a -70 °C. Posteriormente, las concentraciones de insulina se determinaron por ensayo de microelisa usando un procedimiento estandarizado que se basa en el kit de insulina DSL-10-1600 Active™, Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (Webster, TX, USA) y el equipo lector de ELISA BIO-RAD modelo 3550. El kit DSL-10-1600 para la determinación de insulina ha sido utilizado en otros estudios para la determinar las concentraciones de insulina de ratas Wistar albinas diabéticas (48).

Concentraciones sanguíneas de triglicéridos

Las concentraciones de triglicéridos se determinaron en el suero obtenido después de la centrifugación de la sangre, utilizando métodos enzimáticos y colorimétricos con reactivos Serapak-Bayer. Las concentraciones se determinarán en el autoanizador Mega de Merck.

Análisis estadístico

Las bases de datos se crearon en Excel y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS, versión 11,5 para Windows. Las variables estudiadas se describieron por grupos utilizando la media y la desviación estándar. Se utilizó la prueba t para muestras independientes con el fin de determinar diferencias en el peso inicial (antes de iniciar la alimentación especial con dieta normal o grasa), el peso previo a la administración de los péptidos, la ganancia de peso y las concentraciones de leptina según el tipo de dieta; la homogeneidad de las varianzas se verificó mediante la prueba de Levene ($p > 0,05$).

Para comprobar diferencias entre grupos en las variables de leptina, insulina y glucosa se verificó la distribución de los datos y se aplicó el análisis de varianza (ANOVA); si la prueba de ANOVA determinó diferencias estadísticamente significativas, se realizaban también comparaciones *post-hoc* mediante la prueba de Duncan; ambos análisis se trabajaron con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). En los análisis de correlación se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

Consideraciones éticas

Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud (Resolución No. 8430 de 1993), la Ley 84 de 1989 «Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales» y los principios éticos de la experimentación animal del *International Council for Laboratory Animal Science*. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud.

Resultados

En la figura 1 y en el cuadro 2 se detalla el peso y el aumento de peso de las ratas durante el periodo correspondiente al inicio de la dieta normal o de grasa y el momento inmediatamente anterior a la administración de los péptidos; asimismo, las concentraciones de leptina según el tipo de dieta que recibieron los animales. Los resultados demuestran que las diferencias en el peso antes de iniciar el manejo con dieta específica (dieta alta en grasa o dieta normal) no fueron estadísticamente significativas pero en la semana 15 de alimentación con estas dietas los valores de peso y de incremento de peso fueron mayores en los grupos manejados con dieta alta en grasa

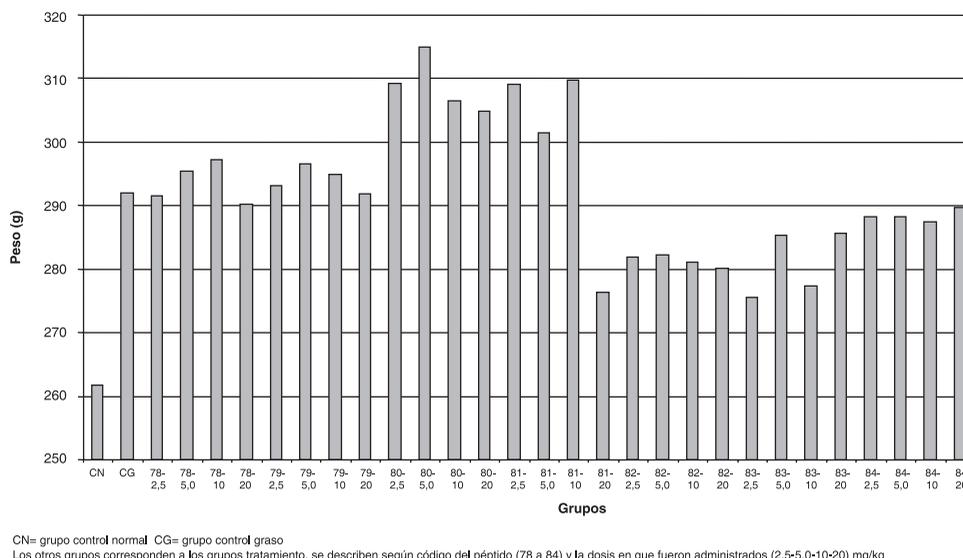


Figura 1. Peso en gramos en la semana quince de dieta específica previo a la administración de los péptidos y según grupos control o de tratamiento

Cuadro 2. Aumento de peso durante el periodo correspondiente al inicio de la dieta normal o de grasa y el momento inmediatamente anterior a la administración de los péptidos, concentraciones de leptina según tipo de dieta que recibieron los animales.

Grupo según tipo de dieta	Peso inicial (g)		Peso final (g)		Ganancia de peso (g)		Leptina concentración promedio (ng/ml)	
	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE
Grupo con dieta normal	213,9	15,0	261,7	14,6	47,8	23,1	0,3	0,3
Grupo con dieta alta en grasa	208,9	23,9	296,0	31,3	87,2	29,1	5,2	4,0
Prueba t entre grupo normal y grupo, asumiendo varianzas iguales (t=0,5; p=0,60)				(t=-2,7; p=0,00)		(t=-3,2; p=0,00)		
Prueba t entre grupo normal y grupo, sin asumir varianzas iguales							(t=-13,9; p=0,00)	
Prueba para determinar igualdad de varianzas	0,33		0,11		0,53		0,00	

Peso inicial: se refiere al peso inicial en gramos en el momento antes de iniciar el manejo con la dieta específica (dieta alta en grasa o dieta normal en grasa).

Peso final: peso en gramos inmediatamente anterior al momento de iniciar la fase de administración de péptidos.

Ganancia de peso: se refiere al aumento de peso en gramos durante el periodo comprendido entre el inicio de la dieta específica y el momento previo a la primera administración de los péptidos.

Cuadro 3. Concentraciones medias de leptina según los grupos conformados como controles y grupos de experimentación.

Grupo	Dosis mg/Kg	Media ng/mL	DE	Grupo	Dosis mg/kg	Media ng/ml	DE	Grupo	Dosis mg/kg	Media ng/ml	DE	Grupo	Dosis mg/kg	Media ng/ml	DE
78	2,5	7,2	2,8	79	2,5	8,2	3,2	80	2,5	4,1	1,1	81	2,5	8,1	1,4
	5,0	3,3	2,8		5,0	6,9	4,5		5,0	6,9	4,6		5,0	8,0	4,5
Total	10	4,1	2,2	Total	10	7,4	4,3	Total	10	8,8	5,3	Total	10	9,9	4,6
	20	3,5	1,9		20	6,5	4,9		20	8,4	3,8		20	7,5	3,8
Total		4,5	2,8	Total		7,3	4,0	Total		7,3	4,2	Control normal †		8,4	3,5
	2,5	1,9	1,6		2,5	2,8	2,0		2,5	1,6	0,7		5,0	2,7	0,9
82				83				84				Tratamientos			
	10	1,6	1,7		10	1,9	1,6		10	3,2	0,9		20	2,6	0,9
Total	20	3,9	2,4	Total	20	0,9	0,5	Total	20	2,6	0,9	Total			
		1,7	1,8		Total	1,6	1,5		Total		2,4		1,0	Total	

ANOVA: (f=4,71; gl-intergrupos=29; gl-intragrupos=123; gl-total=152; p=0,00)
DE= Desviación estándar

en comparación con el grupo control alimentado con dieta normal. En cuanto a las concentraciones de leptina se observa una concentración significativamente mayor en los grupos alimentados con dieta alta en grasa y una concentración menor en el grupo de dieta normal (cuadro 2).

En el cuadro 3 se observan los valores promedio de las concentraciones de leptina distribuidas según grupos tratados con los péptidos o grupos

control; los resultados demuestran nuevamente que existen diferencias en las concentraciones de leptina entre los grupos, con valores más elevados en los que fueron alimentados con dieta alta en grasa y menores valores de leptina en los animales alimentados con dieta normal. Aunque las concentraciones de leptina de los grupos alimentados con dieta alta en grasa fueron mayores a los del grupo control normal, las diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas entre el control normal y los grupos

Cuadro 4. Grupos de tratamiento que presentaron diferencias significativas en las concentraciones de leptina.

Grupos de tratamiento con diferencias significativas en las concentraciones de leptina		
79-2,5 mg/kg / 82-2,5 mg/kg	80-20 mg/kg / 82-5,0 mg/kg	81-10 mg/kg / 82-2,5 mg/kg
80-10 mg/kg / 84-2,5 mg/kg	80-20 mg/kg / 83-5,0 mg/kg	81-10 mg/kg / 83-5,0 mg/kg
80-10 mg/kg / 82-2,5 mg/kg	81-2,5 mg/kg / 82-5,0 mg/kg	81-10 mg/kg / 83-10 mg/kg
80-10 mg/kg / 82-5,0 mg/kg	81-5,0 mg/kg / 82-5,0 mg/kg	81-10 mg/kg / 83-20 mg/kg
80-10 mg/kg / 83-5,0 mg/kg	81-10 mg/kg / 84-2,5 mg/kg	81-20 mg/kg / 82-5,0 mg/kg
80-10 mg/kg / 83-20 mg/kg	81-10 mg/kg / 84-5,0 mg/kg	81-10 mg/kg / 82-5,0 mg/kg

Cuadro 5. Concentraciones medias de insulina según los grupos conformados como controles y grupos de experimentación.

Grupo	Dosis mg/kg	Media ng/ml	Desviación estándar	Grupo	Dosis mg/kg	Media ng/ml	Desviación estándar	Grupo	Dosis mg/kg	Media ng/ml	Desviación estándar	Grupo	Dosis mg/kg	Media ng/ml	Desviación estándar
78	2,5	3,0	0,9	79	2,5	3,1	1,0	80	2,5	3,8	1,6	81	2,5	2,5	0,6
	5,0	2,6	0,7		5,0	3,5	0,4		5,0	3,6	1,7		5,0	2,4	0,5
	10	3,1	0,6		10	3,0	0,6		10	2,1	0,7		10	2,7	2,4
	20	3,4	0,4		20	3,3	1,6		20	2,0	0,3		20	3,4	1,3
	Total	3,0	0,7		Total	3,2	0,9		Total	2,9	1,4		Total	2,8	1,4
82	2,5	2,6	0,7	83	2,5	2,7	1,2	84	2,5	1,4	0,2	Control normal †		5,1	3,2
	5,0	3,1	1,4		5,0	1,7	1,1		5,0	1,6	0,5	Control graso ‡		2,7	1,4
	10	4,9	4,4		10	7,1	8,1		10	1,3	0,1				
	20	2,5	0,4		20	11,8	11,2		20	1,3	0,2				
	Total	3,3	2,4		Total	5,8	7,5		Total	1,4	0,3				

ANOVA: (f=2,5; gl-intergrupos=29; gl-intragrupos=120; gl-total=149; p=0,00)

Las concentraciones de insulina del grupo 83-10 mg/kg son diferentes a los controles y algunos grupos de tratamiento, excepto con los siguientes grupos: 78-2,5 mg/kg, 78-20 mg/kg, 79-5,0 mg/kg, 79-20 mg/kg y 83-20 mg/kg.

-Coeficiente de correlación ganancia de peso–concentraciones de insulina=-0,105

-Coeficiente de correlación peso final (peso en gramos inmediatamente anterior al momento de iniciar la fase de administración de péptidos)–concentraciones de insulina=0,115

-Coeficiente de correlación cambio de peso en gramos después de administrar los péptidos–insulina=-0,231

-Coeficiente de correlación concentraciones de leptina–concentraciones de insulina=-0,019

-Coeficiente de correlación entre concentraciones de glucosa en sangre, valor al iniciar administración de los péptidos–concentraciones de insulina=0,131

-Coeficiente de correlación entre concentraciones de glucosa en sangre, valor al quinto día de administración de los péptidos–concentraciones de insulina=-0,072.

-Coeficiente de correlación concentraciones de triglicéridos–insulina=0,059

78, 80 con dosis de 2,5 mg/kg y 82, 83 y 84 en sus cuatro dosis.

Las concentraciones de leptina de los grupos tratamiento no mostraron diferencias significativas, excepto con algunos de los grupos de los tratamientos 82, 83 y 84 en los que los valores de leptina fueron menores con respecto a otros grupos alimentados con dieta alta en grasa; en el cuadro 4 se describen los grupos de tratamiento entre los que se observaron las diferencias.

Las concentraciones medias de insulina según grupos control y de tratamiento se inclinaron por ser similares, excepto en los grupos 83-10 mg/kg y 83-20 mg/kg donde se observaron concentraciones elevadas de insulina (cuadro 5); sin embargo, las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas entre el grupo 83-20mg/kg y los grupos control y tratamiento y 83-

10 mg/kg con respecto a los controles y a algunos tratamientos. La media de las concentraciones de insulina para todos los grupos fue de $3,1 \pm 2,5$ ng/ml (cuadro 5).

Con respecto a las concentraciones de glucosa en sangre se observó que en la medición correspondiente al primer día de administración de los péptidos los valores de los grupos a los cuales se les administró el péptido 78 y 79 fueron considerablemente mayores que los valores observados en los grupos control normal, control graso y demás grupos de tratamiento (cuadro 6); no obstante, las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo entre los grupos 78-5,0 mg/kg con respecto a los grupos control y los grupos a los que se les administró el péptido 80, 81,,82,,83 y 84 en sus cuatro dosis y 78-20 mg/kg con respecto a los controles y a los grupos 80,,81,,82,,83 y 84 en sus cuatro dosis.

Cuadro 6. Concentración media de glucosa en sangre según los grupos conformados como controles y grupos de experimentación.

Dosis mg/kg	Grupo	C inicial media mg/ml	DE	C final media mg/ml	DE	Diferencia C inicial -C final mg/ml	DE	Grupo	C inicial media mg/ml	DE	C final media mg/ml	DE	Diferencia C inicial -C final media mg/ml	C inicial media mg/ml	Grupo	C inicial media mg/ml	DE	C final media mg/ml	DE	Diferencia C inicial -C final media mg/ml	C inicial media mg/ml
2,5		163,3	66,4	121,8	34,4	-41,5	89,4		142,6	33,1	115,2	26,9	-27,4	28,7		102,0	12,2	105,0	28,5	3,0	35,9
5,0		189,0	69,8	106,7	12,7	-82,2	59,5		161,7	58,8	105,0	12,1	-56,6	57,5		104,2	11,6	108,9	15,4	4,7	16,8
	78							79							80						
10		152,3	59,9	106,8	13,5	-45,5	63,9		153,0	44,9	111,7	12,7	-41,3	34,8		106,3	15,7	115,2	26,3	8,8	34,1
20		183,5	68,2	128,2	29,7	-55,3	85,0		172,0	76,2	109,5	6,2	-62,5	74,7		97,3	13,3	112,8	46,5	15,5	53,5
2,5		115,5	8,5	96,1	3,1	-19,3	7,4		112,7	19,7	103,0	4,2	-9,7	23,5		126,5	11,1	104,2	7,4	-22,5	8,3
5,0		122,5	17,1	109,6	20,7	-12,8	34,3		112,0	14,1	104,0	8,8	-8,0	10,9		124,2	25,9	97,5	12,4	-26,7	31,9
	81							82							83						
10		117,7	10,5	111	19,1	-5,8	23,8		120,5	23,8	105,5	11,9	-15,0	32,3		108,3	6,0	96,7	8,0	-11,7	7,4
20		117,3	14,7	103,8	14,7	-13,5	16,0		130,2	22,9	110,5	4,3	-19,7	23,9		112,0	19,7	111,2	9,2	-7,5	20,5
2,5		122,8	21,2	99,6	35,2	-23,2	37,6														
								Control normal													
5,0		127,2	21,0	109,6	10,0	-17,6	28,6		114,5	24,9	112	26,3	-2,5	22,2							
								Control graso													
10		130,6	19,7	104,4	5,4	-26,2	16,3		112,8	25,6	117,7	18,4	4,8	26,9							
	84																				
20		114,5	13,3	97,5	14,5	-17,0	25,9														

C inicial: se refiere a la concentración de glucosa en sangre en el primer día de administración de los péptidos.

C final: indica concentración de glucosa en sangre en el quinto día de administración de los péptidos.

Diferencia C inicial-C final: señala la diferencia en la glucemia entre el día uno y cinco de administración de los péptidos.

- Coeficiente de correlación concentraciones de glucosa en sangre, valor al iniciar administración de los péptidos Vs. peso en gramos inmediatamente anterior al momento de iniciar la fase de administración de péptidos=0,015
- Coeficiente de correlación entre concentraciones de glucosa en sangre, valor al quinto día de ia administración de los péptidos–peso al finalizar la administración de los péptidos=-0,065.
- Coeficiente de correlación concentraciones de glucosa en sangre, valor al iniciar administración de los péptidos Vs. leptina=-0,02
- Coeficiente de correlación entre concentraciones de glucosa en sangre, valor al quinto día de administración de los péptidos Vs. triglicéridos=-0,049

Glucemia inicial: ANOVA: (f=2,5; gl-intergrupos=29; gl-intragrupos=127; gl-total=156; p=0,00)

Diferencia entre glucemia inicial y final: ANOVA: (f=1,6; gl-intergrupos=29; gl-intragrupos=127; gl-total=156; p=0,03)

Los valores de la glucemia en el día quinto de administración de los péptidos fueron menores con respecto a la primera medición, excluidos el control graso y los grupos a los que se les administró el péptido 80 en sus cuatro dosis (cuadro 6); en estos casos las concentraciones aumentaron. En el control normal se observó un valor 2,5 mg/dl más bajo al de la primera medición pero sin diferencia significativa con el control graso. La comparación entre tratamientos o entre tratamientos y controles en esta medición no mostró diferencias significativas.

El valor del cambio en mg/dl entre la glucemia inicial y la glucemia final muestra de nuevo que en todos los grupos disminuyó la glucemia excepto en los controles y en los grupos a los cuales se les administró el péptido 80. En el cuadro 6 se observan los resultados; el signo negativo indica que hubo disminución de la glucemia y los valores positivos señalan aumento. La reducción alcanzada por el grupo 78-5,0 mg/kg fue estadísticamente diferente con respecto al cambio (aumento o disminución) alcanzado por

los controles y los tratamientos 83-20 mg/kg y 80 en las cuatro dosis.

Los análisis de correlación entre las concentraciones de insulina y las variables de peso, leptina, glucemia y triglicéridos no mostraron ninguna relación (cuadro 5). Igualmente, no se observó correlación entre la glucemia y las variables de peso, leptina y triglicéridos (cuadro 6).

Discusión

Los resultados demostraron un mayor aumento de peso en los animales que fueron alimentados con dieta alta en grasa en comparación con el grupo que recibió dieta normal. Igualmente, se observaron valores más elevados de leptina en los grupos de animales alimentados con dieta alta en grasa que en el grupo con dieta normal; sin embargo, en algunos grupos de tratamiento las concentraciones de leptina aumentaron pero no en la misma proporción (figura 1, cuadro 2-4). Los valores observados en las concentraciones de leptina y el peso alcanzado por los animales alimentados con dieta alta en grasa demuestra

una vez más como una alimentación rica en grasa consumida por un periodo prolongado puede incrementar el peso corporal y, por ello, las concentraciones de leptina (18,19,23,25,49,50); los valores de leptina coinciden con los hallados en otros estudios con ratas Wistar de peso normal y obesas (20,51-53).

Una razón que explicaría porqué algunos tratamientos no incrementaron sus concentraciones de leptina en la misma proporción que los otros tratamientos podría ser por la relación que existe entre el incremento de peso y el aumento en las concentraciones de leptina. En este caso, los grupos 82 a 84 no aumentaron el peso corporal en la misma magnitud que los otros grupos de tratamiento (figura 1); no obstante, nosotros realizamos análisis de correlación entre las concentraciones de leptina y el peso corporal y no se encontró correspondencia entre estas dos variables (coeficiente correlación Spearman=0,32). El hecho de que no haya correlación entre las concentraciones de leptina y el peso corporal podría deberse a que es posible producir cambios en los niveles de leptina por un consumo continuo de grasa pero sin que haya obesidad, es decir que la hiperleptinemia se hace evidente como respuesta a una dieta alta en grasa aun cuando el peso no haya cambiado (54,55).

La explicación para que los grupos 82, 83 y 84 no aumentaran su peso corporal en la misma medida que los otros grupos de tratamiento probablemente se asocia a las evidencias que muestran cómo en las ratas –al igual que en los humanos– existe heterogeneidad en la susceptibilidad para desarrollar obesidad; debido a ello, algunos animales desarrollan el fenotipo de obesidad mientras otros son resistentes y mantienen un peso normal a pesar de consumir bastantes calorías (54,56). Los mecanismos que explican las diferencias en la respuesta a la dieta aún no son claros pero se cree que en las ratas resistentes a la obesidad existen diferencias en la predisposición genética a la obesidad y en los sistemas neurotransmisor y neuromodulador (55). Es posible una disminución de otras proteínas orexigénicas tales como el neuropéptido Y, una disminución en la expresión de proteínas adipogénicas, una tasa mayor de β -oxidación

(57) y una utilización más eficiente de los nutrientes (56).

Las concentraciones de insulina en todos los grupos fueron similares excepto en el grupo 83-10 mg/kg y 83-20 mg/kg; este hallazgo demuestra que, posiblemente, los animales manejados con dieta alta en grasa aunque estuvieron sometidos por un tiempo prolongado a la dieta no llegaron a desarrollar un estado de resistencia a la insulina porque probablemente el peso no aumentó lo suficiente para producirla. Está bien documentada la asociación que existe entre el grado de obesidad y la resistencia a insulina (34,35). Otra posibilidad es que la ausencia de hiperinsulinemia se deba más a que las ratas utilizadas en el estudio fueron aparentemente resistentes a desarrollar obesidad por el consumo de la dieta alta en grasa, situación en la que, además de la oposición a incrementar el peso, también se observa resistencia a incrementar las concentraciones de insulina (58). Existen asimismo reportes de que las dietas altas en grasa pueden causar intolerancia a la glucosa y alteraciones en la función pancreática para la secreción de insulina lo que ocasionaría que las concentraciones de insulina se inclinaran hacia la disminución y no hacia el aumento (59).

La similitud en los valores de insulina entre los tratamientos y los controles graso y normal muestra, además, que los péptidos evaluados no tuvieron efecto sobre las concentraciones plasmáticas de insulina; los resultados obtenidos son contrarios a los obtenidos en estudios con leptina recombinante en los cuales el incremento en los niveles de leptina plasmática seguido a la administración de proteína recombinante, corrige la hiperinsulinemia observada en ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasa (60).

Es posible que en este estudio no se presentara efecto alguno con los péptidos porque no existió hiperinsulinemia en la mayoría de grupos, lo cual podría hacer que el organismo mantuviera su mecanismo usual para preservar la homeostasis de la insulina y reprimiera algún efecto probable de los péptidos.

Es factible, también, que se presentaran cambios en las concentraciones de insulina por la administración de los péptidos pero pudieron

haberse presentado a corto y no a largo plazo; infortunadamente, en este estudio sólo se evaluaron las concentraciones de insulina horas después de la última administración de los péptidos. La hipótesis de un efecto a corto plazo puede ser factible teniendo en cuenta que los modelos de secreción de insulina son de naturaleza pulsátil, con picos que ocurren a intervalos regulares, aproximadamente, cada tres horas (58).

La diferencia de no efecto de los péptidos puede explicarse, además, desde otros aspectos biológicos: 1) es probable que los péptidos miméticos, siendo moléculas distintas a la leptina, estimulen un mecanismo de señalización distinto al de la proteína y, por esta razón, no tengan ninguna repercusión sobre la insulina, permitiendo así que el mecanismo usual de control de las concentraciones de insulina se preserve; 2) es posible que los péptidos miméticos tengan afinidad por el receptor de leptina que permite la activación de las cascadas de señalización relacionadas con el efecto sobre insulina pero que su efecto sea antagónico y alostérico; 3) una misma proteína puede desarrollar varias funciones de manera simultánea, pero esa diversidad funcional puede deberse a distintos segmentos de la secuencia proteica. Esto explicaría por qué los péptidos correspondientes a la secuencias 116-130 de leptina de ratón y 95-109 de leptina humana no produjeron ninguna respuesta en la insulina aunque hay estudios que demuestran su acción sobre el peso corporal, el consumo de alimentos y la glucemia en ratones ob/ob (16,17) y efectos sobre la expresión del gen *C-Fos* por péptidos miméticos de la secuencia 95-109 de la leptina humana (61).

Por otro lado, podría darse el que los péptidos sí llegaran a generar algún efecto sobre la insulina pero que esta acción no fuera evidente sobre las concentraciones plasmáticas sino, tal vez, sobre otros aspectos como la expresión, la secreción y las cascadas de señalización, tal como se ha observado en otros estudios por acción de leptina exógena (26,62); sin embargo, esta hipótesis tendría que ser evaluada en futuras investigaciones.

Los resultados de la glucemia demostraron que algunos de los grupos manejados con dieta alta

en grasa presentaron hiperglucemia y que en el último día de administración de los péptidos, los valores de la glucosa sanguínea disminuyeron en la totalidad de los grupos de tratamiento excluidos los que recibieron el péptido 80 en las cuatro dosis; en estos grupos se aumentaron las concentraciones de glucosa.

La hiperglucemia observada en algunos grupos es concordante con otros estudios que indican que una dieta alta en grasa puede causar alteración de la función pancreática para la secreción de insulina y no hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa (59), disminución en el consumo de glucosa en el músculo y tejido adiposo e incremento en otras células no dependientes de la insulina (63).

Los resultados de la última medición de la glucemia muestran que los péptidos si tuvieron un efecto de reducción de las concentraciones de glucosa, corroborando los resultados de otros estudios en los que la administración de péptidos sintéticos disminuyó la glucemia (16,17) o en los que la administración continua de leptina afectó el metabolismo de la glucosa, independientemente de los cambios en las concentraciones plasmáticas de insulina (35).

Los análisis de correlación entre las concentraciones de insulina y la glucemia final no mostraron ninguna relación, lo que sugiere que la reducción en la glucemia por acción de los péptidos puede estar mediada por otros mecanismos de regulación del metabolismo de la glucosa distintos a la insulina o, simplemente, a que se optimizó la sensibilidad a la insulina para que el transporte de la glucosa al interior de las células fuera más eficiente (64). También, es factible que la falta de correlación entre glucemia e insulina se deba más al efecto del tipo de dieta ofrecida que, según reportes de investigaciones, afectaría la glucemia pero no la insulina en sangre (59).

En conclusión, los resultados sugieren que los péptidos miméticos de leptina no generan el mismo efecto observado con la utilización de leptina recombinante sobre las concentraciones de insulina en ratas alimentadas con dieta alta en grasa; sin embargo, no descarta totalmente la posibilidad de cambios relacionados con la

actividad de la insulina por acción de los péptidos dado que son posibles otros efectos sobre la insulina. Se requieren otras investigaciones para determinar si los péptidos miméticos de leptina pueden ejercer algún control sobre la insulina, podría ser la evaluación de las concentraciones de insulina por el uso de los péptidos teniendo en cuenta el ritmo pulsátil de la hormona y los estudios de carácter molecular y celular para evaluar la influencia en el control de la insulina, mecanismos de expresión, secreción y señalización.

A diferencia de los resultados obtenidos sobre la insulina, los péptidos sí ejercen efectos de reducción en las concentraciones de glucosa en sangre. Los cambios aparentemente no están relacionados a variaciones en las concentraciones plasmáticas de insulina pero podrían estar asociados con los procesos de señalización estimulados por la insulina para el transporte de glucosa hacia el interior de la célula o con otros mecanismos de regulación del metabolismo de la glucosa; se requieren más investigaciones al respecto.

Agradecimientos

Agradecemos a los profesionales que participaron en la recolección de las muestras de sangre y en el control de los animales.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no existen conflictos de intereses en la elaboración y ejecución de este proyecto.

Financiación

El proyecto fue financiado por el Instituto Nacional de Salud y la Pontificia Universidad Javeriana, y como entidad cofinanciadora, Colciencias (código del proyecto 2104-04-12689).

Referencias

1. **Friedman JM, Halaas JL.** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395:763-70.
2. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-32.
3. **Madej T, Boguski MS, Bryant SH.** Threading analysis suggest that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett*. 1995;373:13-8.
4. **Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, et al.** Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*. 1997;387:206-9.
5. **Cammisotto PG, Bukowiecki LJ.** Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C244-50.
6. **Considine RV.** Human leptin: an adipocyte hormone with weight-regulatory and endocrine functions. *Semin Vasc Med*. 2005;5:15-24.
7. **Rayner DV, Trayhurn P.** Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med*. 2001;79:8-20.
8. **Fruhbeck G, Aguado M, Martinez JA.** *In vitro* lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;240:590-4.
9. **Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B.** Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci*. 1998;18:559-72.
10. **Spiegelman BM, Flier JS.** Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001;104:531-43.
11. **Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG.** Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology*. 2002;143:239-46.
12. **Jacob RJ, Dziura J, Medwix MB, Leone P, Caprio S, Doring M, et al.** The effect of leptin is enhanced by microinjection into the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* 1997;46:150-2.
13. **Mercer JG, Hoggard N, Williams LM; Lawrence CB, Hannah LT, Trahurn P.** Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain region by *in situ* hybridization. *FEBS Lett*. 1996;387:113-6.
14. **Savioz A, Charnay Y, Huguenin C, Graviou C, Greggio B, Bouras C.** Expression of leptin receptor mRNA (long form splice variant) in the human cerebellum. *Neuroreport*. 1997;8:3123-6.
15. **Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG.** Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 1996;98:1101-6.
16. **Grasso P, Leinung MC, Ingher SP, Lee DW.** *In vivo* effects of leptin related synthetic peptides on body weight and food intake in female ob/ob mice. Localization of leptin activity to domains between aminoacid residues 106-140. *Endocrinology*. 1997;138:1413-8.
17. **Rozhavskaya-Arena M, Lee DW, Leinung MC, Grasso P.** Design of a synthetic leptin agonist: effects on energy balance, glucose homeostasis, and thermoregulation. *Endocrinology*. 2000;141:2501-7.
18. **Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF.** Development of high fat diet-induced obesity and leptin

- resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:639-46.
19. **Vasselli JR.** Behavioral and biological determinants of leptin resistance. *Appetite.* 2001;37:115-7.
 20. **Fernandez-Galaz C, Fernandez-Agullo T, Perez C, Peralta S, Arribas C, Andres A, et al.** Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia.* 2002;45:997-1003.
 21. **Kim-Motoyama H, Yamaguchi T, Katakura T, Miura M, Ohashi Y, Yazaki Y, et al.** Serum leptin levels are associated with hyperinsulinemia independent of body mass index but not with visceral obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;239:340-4.
 22. **Dagogo-Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers J, Landt M.** Plasma leptin and insulin relationships in obese and nonobese humans. *Diabetes.* 1996;45:695-8.
 23. **Sahu A.** Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol.* 2003;24:225-53.
 24. **Steinberg GR, Dyck DJ.** Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279:E1374-82.
 25. **Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng Z, Rossetti L.** Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes.* 2001;50:2786-91.
 26. **Yaspelkis B 3rd, Singh MK, Krisan AD, Collins DE, Kwong CC, Bernard JR, et al.** Chronic leptin treatment enhances insulin-stimulated glucose disposal in skeletal muscle of high-fat fed rodents. *Life Sci.* 2004;74:1801-16.
 27. **Muller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G.** Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.* 1997;272:10585-93.
 28. **Walder K, Filippis A, Clark S, Zimmet P, Collier GR.** Leptin inhibits insulin binding in isolated rat adipocytes. *J Endocrinol.* 1997;155: R5-7.
 29. **Zhao AZ, Bornfeldt KE, Beavo JA.** Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest.* 1998;102:869-73.
 30. **Sweeney G, Keen J, Somwar R, Konrad D, Garg R, Klip A.** High leptin levels acutely inhibit insulin-stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in L6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology.* 2001;142:4806-12.
 31. **Pérez C, Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Arribas C, Andrés A, Ros M, et al.** Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes.* 2004;53:347-53.
 32. **Sivitz WI, Walsh SA, Morgan DA, Thomas MJ, Haynes WG.** Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology.* 1997;138:3395-401.
 33. **Lichnovska R, Gwozdziwiczova S, Chlup R, Hrebicek J.** Serum leptin in the development of insulin resistance and other disorders in the metabolic syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149:119-26.
 34. **Havel PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL, Stern JS.** Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:4406-13.
 35. **Guven S, El-Bershawi A, Sonnenberg GE, Wilson CR, Hoffmann RG, Krakower GR, et al.** Plasma leptin and insulin levels in weight-reduced obese women with normal body mass index: relationships with body composition and insulin. *Diabetes.* 1999;48:347-52.
 36. **Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW.** Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology.* 1997;138:4463-72.
 37. **Doucet E, ST-Pierre S, Almeras N, Mauriege P, Despres J, Richard D, et al.** Fasting insulin levels influence plasma leptin levels independently from the contribution of adiposity: evidence from both a cross-sectional and an intervention study. *J Clin Endocrinol.* 2000;85:4231-6.
 38. **Vidal H, Auboeuf D, de Vos P, Staels B, Riou JP, Auwerx J, et al.** The expression of ob gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue. *J Clin Invest.* 1996;98:251-5.
 39. **Wang J, Chinookoswong N, Scully S, Qi M, Shi ZQ.** Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization *in vivo*. *Endocrinology.* 1999;140:2117-24.
 40. **Hidaka S, Yoshimatsu H, Kondou S, Tsuruta Y, Oka K, Noguchi H, et al.** Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. *FASEB J.* 2002;16:509-18.
 41. **Grasso P, Rozhavskaya-A, Leinung MC, Lee DW.** D-Leu-4- OB3, a synthetic leptin agonist, improves hyperglycemic control in C57BL/6j ob/ob mice. *Regul Pept.* 2001;101:123-9.
 42. **Poveda E, Lareo L.** Diseño teórico de péptidos miméticos de leptina diseñados por computador y postulados como farmacóforos potenciales para tratamiento de obesidad. *Lecturas sobre Nutrición* 2001;3:40-52.
 43. **Fong TM, Huang RR, Tota MR, Mao C, Smith T, Varnerin JVV, et al.** Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol.* 1998;53:234-40.
 44. **Sarin VK, Kent SB, Tam JP, Merrifield RB.** Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem.* 1981;117:147-57.

45. **Guzman F, Barberis S, Llanes A.** Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2007;10:279-314. [Consultado: mayo 7 de 2007]. Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue2/full/13/13.pdf>.
46. **Santovena A, Oliva A, Guzman F, Patarroyo ME, Llabres M, Fariña JB.** Chromatographic characterization of synthetic peptides: SPf66 malaria vaccine. *J Chromatog B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;766:3-12.
47. **Noya O, Patarroyo ME, Guzmán F, Alarcón de Noya B.** Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Curr Protein Pept Sci*. 2003;4:299-308.
48. **Khanam R, Pillai KK.** Effect of chromium picolinate on modified forced swimming test in diabetic rats: involvement of serotonergic pathways and potassium channels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006;98:155-9.
49. **Cha MC, Jones PJ.** Dietary fat type and energy restriction interactively influence plasma leptin concentration in rats. *J Lipid Res*. 1998;39:1655-60.
50. **Steinberg GR, Dyck DJ.** Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279:E1374-82.
51. **Lu H, Duanmu Z, Houck C, Jen KL, Buisson A, Dunbar JC.** Obesity due to high fat diet decreases the sympathetic nervous and cardiovascular responses to intracerebroventricular leptin in rats. *Brain Res Bull*. 1998;47:331-5.
52. **Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW.** Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:438-42.
53. **Eiden S, Preibisch G, Schmidt I.** Leptin responsiveness of juvenile rats: proof of leptin function within the physiological range. *J Physiol*. 2001;530:131-9.
54. **Tulipano G, Vergini AV, Soldi D, Muller EE, Cochi D.** Characterization of the resistance to the anorectic and endocrine effects of leptin in obesity-prone and obesity-resistant fed a high-fat diet. *J Endocrinol*. 2004;183:289-98.
55. **Otukonyong EE, Dube MG, Torto R, Kalra PS, Kalra SP.** High-fat diet-induced ultradian leptin and insulin hypersecretion are absent in obesity-resistant rats. *Obes Res*. 2005;13:991-9.
56. **Archer ZA, Rayner DV, Rozman J, Klingenspor M, Mercer JG.** Normal distribution of body weight gain in male Sprague-Dawley rats fed a high-energy diet. *Obes Res*. 2003;11:1376-83.
57. **Jang I, Hwang D, Lee J, Chae K, Kim Y, Kang T, et al.** Physiological difference between dietary obesity-susceptible and obesity-resistant Sprague Dawley rats in response to moderate high fat diet. *Exp Anim*. 2003;52:99-107.
58. **Otukonyong EE, Dube MG, Torto R, Kalra PS, Kalra SP.** High-fat diet-induced ultradian leptin and insulin hypersecretion are absent in obesity-resistant rats. *Obes Res*. 2005;13:991-9.
59. **Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W.** The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab*. 2004;6:120-6.
60. **Buettnner R, Newgard CB, Rhodes CJ, O'Doherty RM.** Correction of diet-induced hyperglycemia, hyperinsulinemia, and skeletal muscle insulin resistance by moderate hyperleptinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278:E563-9.
61. **Oliveira VX Jr, Fazio MA, Miranda MT, da Silva JM, Bittencourt JC, Elias CF, et al.** Leptin fragments induce Fos immunoreactivity in rat hypothalamus. *Regul Pept*. 2005;127:123-32.
62. **Clegg DJ, Riedy CA, Smith K, Benoit SC, Woods SC.** Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes*. 2003;52:682-7.
63. **Matsuo T, Iwashita S, Komuro M, Suzuki M.** Effects of high-fat diet intake on glucose uptake in central and peripheral tissues of non-obese rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1999;45:667-73.
64. **Langouche L, van den Berghe G.** Glucose metabolism and insulin therapy. *Crit Care Clin*. 2006;22:119-29.