

Revisiones

La reproducción en las hembras de mamíferos es extremadamente sensible a la disponibilidad de combustibles metabólicos. Esta relación entre la homeostasis energética y la reproducción ha sido reconocida durante décadas. Así, la restricción dietética intensa, los estados catabólicos y el exceso del gasto energético deterioran la fertilidad humana. Del mismo modo, la obesidad resultante de una mayor ingestión que la requerida por el cuerpo está asociada con situaciones de infertilidad como en el síndrome de ovarios policísticos. Por ello, la reproducción, la ingestión de alimento y la utilización de combustibles constituyen las respuestas homeostáticas reguladas por señales metabólicas. Así, la capacidad reproductiva en organismos inferiores como el gusano y la mosca está también influida por la disponibilidad de alimento y las reservas de energía. Sin embargo, el modo preciso de la regulación de la actividad reproductiva por la nutrición y la energía metabólica continúa siendo una cuestión sin resolver de la biología moderna. Se postula que la insulina es la principal hormona reguladora del metabolismo de hidratos de carbono en el organismo y junto con las rutas de señales dependientes de ella, desempeña un papel primordial en la homeostasis de combustibles metabólicos. Verificaciones recientes procedentes de modelos animales demuestran que la acción de la insulina también regula la ingestión de comida, el peso corporal y la capacidad de reproducción, implicando a las rutas de señalización de la insulina como la conexión mecanística entre el metabolismo y la regulación neuroendocrina de la fertilidad. La delección de IRS-2, uno de los principales sustratos del receptor de insulina, produce en el ratón defectos tanto metabólicos como reproductivos. Las ratonas deficientes en IRS-2 demuestran una moderada intolerancia a glucosa, resistencia a insulina, hiperfagia y una discreta obesidad. Curiosamente, estos animales son infértiles debido a defectos en el ovario y/o en el eje hipotálamo-pituitario-ovárico. Aquí se revisan las perspectivas históricas del control metabólico de la reproducción haciendo un especial énfasis en las contribuciones de la señalización de la insulina. Además, nuestra revisión se centra en las observaciones recientes del modelo *knockout* de IRS-2, que nos ha proporcionado una evidencia directa de que la fertilidad requiere la integración de señales metabólicas y reproductivas. Basándonos en el papel de las rutas de señalización de la insulina en la regulación de la fertilidad, el metabolismo y la longevidad en *C. elegans* y *Drosophila*, nuestra hipótesis de trabajo es que las rutas de señales mediadas por IRS-2 representan un mecanismo conservado evolutivamente que comunica la homeostasis energética con la fisiología de la reproducción.

Palabras clave: Insulina. Metabolismo. Reproducción. Proteínas IRS.

Las rutas de señales de la insulina: mecanismos de integración de la homeostasis energética y la reproducción

J. FONT DE MORA SAÍNZ^a y D. BURKS^b

^aCentro de Investigación del Cáncer. Salamanca. ^bJoslin Diabetes Center. Harvard Medical School. Boston.

INSULIN SIGNALING PATHWAYS: MECHANISMS INTEGRATING ENERGY HOMEOSTASIS AND REPRODUCTION

In female mammals, reproduction is extremely sensitive to the availability of metabolic fuels. This relationship between energy homeostasis and reproduction has been recognized for decades; severe dietary restriction, catabolic states, and excess energy expenditure impair fertility in humans. Likewise, obesity, resulting from a greater consumption than is used by the body, is also associated with infertile conditions such as polycystic ovary syndrome. Thus, reproduction, food intake, and fuel utilization represent homeostatic responses that are modulated by metabolic signals. Interestingly, reproductive capacity in lower organisms such as *C. elegans* and *Drosophila* is also influenced by the availability of food and energy stores. However, precisely how nutrition and energy metabolism regulate reproductive activity remains one of the major unsolved questions of modern biology. As the principal hormone regulating carbohydrate metabolism, insulin and its signaling pathways have been postulated to play a major role in fuel homeostasis. However, recent evidence from mouse models demonstrates that insulin action also regulates food intake, body weight and reproductive capacity, implicating insulin signaling pathways as a mechanistic link between metabolism and neuroendocrine regulation of fertility. Deletion of IRS-2, one of the main substrates of the insulin receptor, produces both metabolic and reproductive defects in mice. Female IRS-2 deficient mice display moderately impaired glucose tolerance, insulin resistance, hyperphagia, and mild obesity. Interestingly, these animals are infertile owing to ovarian failure and/or defects in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. Here, we summarize the historic perspectives of the metabolic control of reproduction with a particular emphasis on the contributions of insulin signaling. Moreover, our review focuses on recent observations from the IRS-2 knockout model which have provided direct evidence that fertility requires the integration of metabolic and reproductive signals. Based on the role of insulin-signaling pathways in the regulation of fertility, metabolism, and longevity in *C. elegans* and *Drosophila*, our working hypothesis is that IRS2-mediated pathways represent an evolutionary conserved mechanism to link energy homeostasis to reproductive physiology.

Key words: Insulin. Metabolism. Reproduction. IRS proteins.

Correspondencia: Dr. J. Font de Mora.
Centro de Investigación del Cáncer. Campus Miguel de Unamuno.
Avda. Universidad de Coimbra, s/n. 37007 Salamanca.
Correo electrónico: jaime@gugu.usal.es

Manuscrito recibido el 19-4-2001; aceptado para su publicación el 28-5-2001.

CONTROL METABÓLICO DE LA REPRODUCCIÓN

La fisiología de la reproducción está regulada por señales metabólicas derivadas de cambios en el carburante metabólico. Aunque resulta muy crítico para la supervivencia de las especies, los procesos de la reproducción son energéticamente costosos e innecesarios para la supervivencia inmediata. Por ello, cuando la comida es abundante y los requerimientos energéticos son bajos, la energía está disponible para todos los procesos fisiológicos que conlleva la vida: locomoción, digestión, termorregulación, crecimiento y reparación celulares y reproducción. El exceso puede ser almacenado en forma de lípidos en el tejido adiposo como una inversión energética a largo plazo. Sin embargo, cuando la disponibilidad energética está limitada y/o el gasto energético es elevado, los mecanismos fisiológicos que distribuyen la energía en las distintas actividades favorecerán los procesos que aseguren la supervivencia del individuo por encima de los procesos que promueven el crecimiento, la longevidad y la reproducción. Así, las actividades reproductivas reciben una baja prioridad respecto a los procesos esenciales como la respiración celular y la termorregulación.

El concepto de que la capacidad reproductiva está modulada por señales provenientes de la disponibilidad del combustible metabólico es conocido como "hipótesis metabólica"¹⁻³. Esta hipótesis surgió de estudios que demuestran que el contenido de grasa corporal, la admisión calórica, la temperatura ambiente y el ejercicio no actúan de forma independiente sino que interactúan controlando la función reproductiva. Por ello, la privación crónica de comida inhibe el ciclo estral pero sólo después de que los almacenes de glucógeno y de grasa han sido consumidos⁴⁻⁶. Este desajuste metabólico puede observarse en trastornos nutricionales humanos como la anorexia nerviosa. Además, las situaciones que producen un excesivo gasto energético como el ejercicio prolongado y la exposición constante al frío, inhiben el ciclo estral solamente cuando el gasto energético no es compensado por un aumento en la ingestión calórica o en la utilización de las reservas del tejido adiposo^{4,7,8}. Por ejemplo, las irregularidades menstruales y la amenorrea son bastante frecuentes en atletas y bailarinas que no aumentan de forma adecuada el consumo de comida para poder compensar las demandas energéticas de su entrenamiento⁸.

Como una alternativa a la hipótesis metabólica, la teoría "adipostática" o "lipostática" propone que la reproducción y la ingestión de comida están coordinadas por un hipotético monitor del contenido en grasa corporal que inhibe la reproducción y aumenta la ingestión de comida cuando las reservas de grasa descienden por debajo de un límite determinado⁹⁻¹³. Esta conexión entre la grasa corporal y la ingestión de comida fue conceptualizada en los años cincuenta cuando Kennedy postuló que señales proporcionales a la grasa corporal regulan el apetito y la alimentación a través del cerebro¹⁴. Dado que la grasa se localiza en múltiples sitios distribuidos por todo el cuerpo, existen diversas posibilidades de que la grasa corporal estaría regulada por centros superiores en el cerebro. Por ejemplo, las conexiones nerviosas de cada depósito de grasa podrían converger en un lugar central en el cerebro desde donde se generaría una señal adipocítica total. Sin embargo, esto es improbable dado que el tejido adiposo está sólo levemente innervado y la mayoría de las conexiones tienen un origen motor. Estudios de la última década sugieren que se secretan hormonas en la periferia de forma proporcional al contenido en grasa corporal y son estas hormonas adipostáticas las que proporcionan señales al cerebro regulando el apetito, la ingestión de comida y la reproducción. Tanto la insulina como la leptina poseen los requerimientos funcionales para ser consideradas hor-

monas adipostáticas y, por tanto, se han propuesto como los reguladores más probables del almacén de grasa y de la ingestión de comida. Para que una señal sea considerada como reguladora de la obesidad debe ser secretada proporcionalmente al almacén de grasa, debe tener acceso al sistema nervioso central (SNC) y debe regular el apetito y el peso corporal^{15,16}.

OBESIDAD Y CAPACIDAD REPRODUCTIVA

La obesidad es el resultado del desequilibrio entre la energía incorporada y la empleada por el cuerpo. A medida que la energía es almacenada, las células grasas aumentan, produciéndose los rasgos característicos de la obesidad. El aumento patológico de las células grasas altera los valores de muchos péptidos y señales nutricionales, que son las responsables del estado de la obesidad como enfermedad¹⁷. Aunque la obesidad se correlaciona de manera muy significativa con la resistencia a la insulina, todavía no se ha determinado si la resistencia a la insulina es causa o consecuencia de la obesidad¹⁸. Queda claro que la obesidad tiene una influencia significativa en el sistema reproductor. Resultados epidemiológicos demuestran que el sobrepeso contribuye a desarreglos menstruales, infertilidad y diabetes mellitus^{5,6,8}. La obesidad es la característica principal en mujeres con el síndrome de ovarios policísticos (SOPC), la alteración endocrinológica más frecuente en mujeres en edad de procrear. El SOPC se caracteriza por una anovulación hiperandrogénica y está frecuentemente asociado con la resistencia a insulina^{19,20}. Las mujeres con SOPC evidencian un mayor riesgo a desarrollar diversas alteraciones metabólicas (a los 40 años de edad, el 40% de las mujeres con SOPC desarrollan diabetes de tipo 2 como consecuencia de la resistencia a insulina y la intolerancia a glucosa)^{20,21}. La inducción de la ovulación y la fertilización *in vitro* es menos alcanzable en mujeres obesas; sin embargo, la pérdida de peso y la modificación del estilo de vida mejora significativamente las anomalías del ciclo menstrual y, por tanto, ejerce una influencia positiva en el resultado final de la reproducción asistida^{22,23}. No se conocen claramente los mecanismos moleculares por los que la obesidad regula negativamente la fertilidad, pero muy probablemente estén asociados a cambios en la sensibilidad a insulina^{17,22}.

LA LEPTINA COMO REGULADOR DE LA OBESIDAD

De acuerdo con la versión moderna de la hipótesis adipostática, los valores de leptina en el plasma proporcionan la información crítica al cerebro sobre el contenido de grasa en el cuerpo, y esta hormona sirve como un regulador del apetito y de la ingestión de comida^{9,15,16,24-26}. La leptina es secretada por los adipocitos en proporción directa al contenido de grasa almacenada^{24,27-32}. La leptina circulante es transportada al cerebro a través de la sangre, en donde se une a sus receptores en el núcleo arcuato y en otros núcleos ventrales del hipotálamo^{10,12,33-38}. La administración local de leptina en estas regiones del cerebro hace disminuir la ingestión de comida y, eventualmente, el peso corporal³⁹⁻⁴³. Los ratones homocigotos en mutaciones del gen de la leptina (*ob/ob*) son hiperfágicos y obesos debido a la insuficiencia de leptina^{44,45}. Del mismo modo, animales con una deficiente señalización por leptina debido a defectos en el gen que codifica para el receptor de leptina (ratones *db/db*) demuestran un aumento en el apetito y en la obesidad^{36,45-48}. Resulta interesante que tanto los ratones *ob/ob* como los *db/db* son infértiles^{49,50}. Se ha comprobado que la administración de leptina a hembras *ob/ob* les devuelve el apetito normal, la obesidad y la fertilidad^{51,52}. Curiosamente, tanto

la obesidad como la hiperfagia son características comunes en humanos portadores de mutaciones (aunque poco frecuentes) en los genes *ob* y *db*^{28,30,31,53}.

Mientras que estas observaciones en los modelos animales de leptina revelan el papel de esta hormona en la regulación del apetito y en el almacén de la grasa corporal en la teoría adipostática como base de la integración de la homeostasis energética y la reproducción tiene diversos fallos. En primer lugar, la secreción de leptina no controla los cambios agudos y rápidos del metabolismo sino que su valor diario global es, sin embargo, directamente proporcional al tamaño de las reservas grasas^{2,3,54-57}. No obstante, estudios empleando inhibidores farmacológicos de la oxidación de la glucosa y de ácidos grasos indican que la fisiología de la reproducción responde, a corto plazo (minuto a minuto u hora a hora), a cambios en la disponibilidad del combustible metabólico más que a cualquier otro aspecto del tamaño corporal o composición⁴. De acuerdo con esto, concentraciones elevadas de leptina no son suficientes para una reproducción normal si la oxidación de los metabolitos está bloqueada^{58,59}. Finalmente, el papel de la leptina en el ser humano permanece sin esclarecerse todavía. Se han encontrado mutaciones en los genes de leptina y de su receptor en el hombre, pero éstos sólo explican unos pocos casos raros de obesidad humana^{17,51,60-62}. Además, en desajustes endocrínicos asociados con la infertilidad como en SOPC, no existe una correlación entre los valores de leptina y otros parámetros de la enfermedad. Por ello, el papel (o papeles) de la leptina en la regulación tanto de la homeostasis energética como de la reproducción permanece sin desvelarse.

INSULINA, HOMEOSTASIS DE LA ENERGÍA Y LA REPRODUCCIÓN

La insulina secretada por las células β pancreáticas regula la homeostasis de la glucosa mediante la estimulación de la incorporación de la glucosa por tejidos periféricos, la supresión de la secreción de ácidos grasos por el tejido adiposo y la inhibición de la producción de glucosa por el hígado. La resistencia a la acción periférica de la insulina está asociada a una gran variedad de desajustes metabólicos que incluyen la obesidad, la diabetes de tipo 2 y SOPC. Aunque el músculo, la grasa y el hígado están generalmente considerados como los principales tejidos sensibles a la insulina, ésta también ejerce una influencia directa en la fisiología del ovario y sus disfunciones pueden ser la razón fundamental de defectos en la ovulación característicos de SOPC^{20,63}. La insulina posee un efecto estimulante en la síntesis de esteroides por las células de la granulosa de ovarios normales y SOPC e interactúa con gonadotropinas de una forma aditiva o sinérgica²⁰. La insulina también estimula la producción esteroidea en las células de la teca de ovarios SOPC⁶⁴. Además, tanto la insulina como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I) parecen regular el desarrollo del folículo⁶⁵.

El receptor de insulina se expresa también en el tejido neuronal del SNC, y demuestra diversas pautas de expresión en el bulbo olfativo, en el hipotálamo y en la glándula pituitaria⁶⁶⁻⁶⁸. La idea de que la insulina puede estar participando en el SNC regulando la ingestión de comida y el peso corporal fue propuesta originalmente por Woods y Porte⁶⁹ hace más de 20 años, siendo acogida con un gran escepticismo. Sin embargo, desde entonces, se han ido acumulando datos que apoyan esta hipótesis, incluyendo estudios que demuestran que la insulina se transporta a través de la barrera sanguínea del cerebro, evidenciando unos su eficacia en la supresión de la ingestión alimenticia cuando se suministra directamente en el cerebro^{15,69-72} y revelando otros estu-

dios la expresión del receptor de insulina en áreas del cerebro involucradas en la homeostasis energética⁶⁶⁻⁶⁸. Con todo ello, hoy día se acepta que el transporte de insulina de la periferia al SNC puede contribuir a la negativa regulación retroactiva de la grasa corporal. Anormalidades fisiológicas como la obesidad, asociadas con la resistencia periférica a insulina, pueden también reducir la eficiencia de la actividad de la insulina en el SNC y predisponer a la ganancia de peso. Curiosamente, se ha demostrado en perros que la obesidad inducida por una dieta rica en grasa está asociada a una reducción de la insulina circulante, reduciéndose los valores de insulina en un 60%⁷³.

Importantes resultados que apoyan la hipótesis de que la insulina actúa no sólo en la periferia, sino también en el SNC controlando el peso corporal y la reproducción, han sido dadas por un reciente estudio de ratones con una delección específica del receptor de insulina en el cerebro (ratones NIRKO). Empleando la tecnología Cre-loxP, Brunning et al han creado un modelo animal para investigar la señalización de la insulina en el cerebro y sus contribuciones en la homeostasis energética⁷⁴. Estos animales demuestran un mayor consumo de alimentos, poseen un aumento en la grasa corporal y están predispuestos a los efectos de obesidad promovidos por una dieta rica en grasa. Estas observaciones proporcionan una nueva evidencia a favor de la idea de que la señalización de la insulina en el cerebro participa en el control del apetito y del gasto energético. Curiosamente, las ratonas NIRKO padecen una reducida fertilidad muy probablemente debida a irregularidades hipotalámicas en la secreción de la hormona luteinizante (LH). Las hembras NIRKO poseen concentraciones de LH circulante en plasma inferiores a las hembras control. Las neuronas del núcleo arcuado del hipotálamo que expresan hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) también expresan el receptor de insulina por lo que esta colocalización puede representar un mecanismo para la interacción entre estas dos hormonas. Por tanto, el modelo NIRKO nos proporciona evidencias directas de que la señalización del receptor de insulina participa en la regulación de la homeostasis energética y en el control neuroendocrino de la reproducción.

LA RED DE SEÑALES DEL SUSTRATO DEL RECEPTOR DE INSULINA (IRS)

La insulina e IGF-I regulan una amplia variedad de efectos metabólicos y efectos relacionados con el crecimiento en los tejidos diana, incluyendo la estimulación del transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno, la inhibición de la gluconeogénesis hepática, la estimulación de la lipogénesis y antilipólisis en adipocitos, la transcripción y traducción de genes y el efecto antiapoptótico y la replicación celular⁷⁵⁻⁷⁷. Mientras que la señal de la insulina es considerada fundamentalmente como metabólica, el IGF-I ha sido implicado como un importante regulador del desarrollo embrionario y posnatal, posiblemente desempeñando un papel de mitógeno y de factor de diferenciación⁷⁵. Las dos hormonas se unen a sus respectivos receptores de membrana, lo que estimula la autofosforilación de la región reguladora localizada en la cadena β del receptor y potenciando su actividad intrínseca tirosinasa. El receptor activado es capaz de fosforilar diversas proteínas celulares, principalmente a miembros de la familia de proteínas IRS (fig. 1).

La familia de proteínas IRS está integrada por al menos cuatro miembros: IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4. IRS-1 parece estar expresada ubicuamente⁷⁸. IRS-2 se descubrió inicialmente como un componente de la señalización de interleucina-4, pero hoy día se sabe que se expresa en casi todas las células y tejidos⁷⁹; IRS-3 se expresa predominantemente

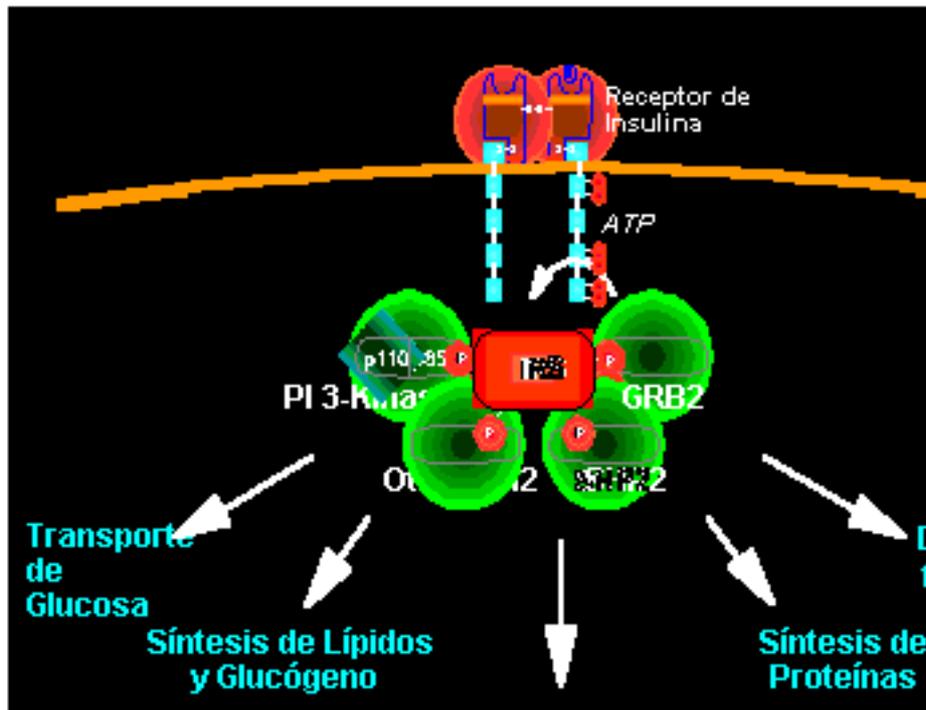


Fig. 1. Rutas de señales mediadas por IRS. Después de la unión de la insulina a su receptor, las proteínas IRS se fosforilan en tirosinas y activan a su vez otras rutas de señales. El acoplamiento entre estas proteínas controlan la respuesta celular final a la insulina y el IGF-I.

en el tejido adiposo y se purificó y clonó a partir de adipocitos de rata⁸⁰⁻⁸²; IRS-4 se purificó y clonó de células HEK293, en las que es la proteína IRS mayoritaria⁸³⁻⁸⁵. IRS-4 se expresa predominantemente en la glándula pituitaria, el timo y el cerebro⁸³. Las proteínas IRS contienen de 8 a 18 localizaciones potenciales de fosforilación en diversas tirosinas que, tras su fosforilación, se unen a los dominios SH2 de proteínas efectoras. Entre ellas destacan la subunidad reguladora de la cinasa lipídica fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), Grb2, Nck y la fosfatasa SHP2 (fig. 1). Se conocen otras proteínas que también se unen, pero su función es poco conocida. Los productos de PI3K activan a su vez una red de serintreonincinas implicadas en la acción de la insulina sobre el transporte de glucosa, síntesis de proteínas, antilipólisis y el control de la gluconeogénesis hepática⁷⁷. Así, el entramado de señalizaciones mediadas por las proteínas IRS regulan los efectos pleiotrópicos de la insulina y el IGF-I en las distintas funciones celulares.

LA DISRUPCIÓN DE IRS-2 CAUSA DIABETES DEBIDO A LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y A LA INSUFICIENCIA DE LAS CÉLULAS BETA

La eliminación del gen de IRS-2 en ratones produce un fenotipo característico de diabetes de tipo 2, y los animales deficientes en IRS-2 evidencian defectos tanto en la acción como en la producción de la insulina⁸⁶. En edades tan tempranas como a 3 días posparto, los animales IRS-2^{-/-} poseen un elevado contenido de glucosa en sangre, y de 3 a 6 semanas de edad los animales macho evidencian un test de tolerancia a la glucosa (GTT) fuertemente anormal. Los ratones IRS-2^{-/-} tienen resistencia periférica a insulina, como lo confirman el aumento en los niveles de insulina en ayunas (tres veces superior a ratones control) y la disminuida respuesta en el test de tolerancia a la insulina (ITT). A las 8 semanas, los ratones macho IRS-2^{-/-} han mermado su capacidad de almacenar glucosa en el cuerpo y han reducido la supresión

hepática de glucosa, ambas inducidas por la insulina en condiciones normales. Estos hechos sugieren el aumento de la resistencia a insulina en el hígado y músculo esquelético. A las 10 semanas, los ratones macho IRS-2^{-/-} son claramente diabéticos y a las 12 semanas, si no son tratados de forma adecuada, evidencian una grave hiperglucemia, polidipsia y poliuria y mueren de deshidratación y de coma hiperosmolar. Llama la atención el hecho de que el fenotipo diabético de este modelo evidencia un dimorfismo sexual ya que a diferencia de la temprana diabetes de los machos, las hembras de los *knockout* IRS-2 (IRS-2^{-/-}) sólo padecen una suave hiperglucemia que se prolonga hasta los 4-5 meses de edad. A partir de esta edad la tolerancia a glucosa se deteriora y las complicaciones de la diabetes se desencadenan también en las hembras⁵⁸.

El análisis morfométrico de secciones pancreáticas de ratones de 4 semanas de edad (momento en el que ocurre un aumento en la masa de células β) revela una significativa reducción en el contenido de células β en ratones IRS-2^{-/-} respecto a animales control. El número de islotes en los animales IRS-2^{-/-} disminuye en aproximadamente un 50%. Además, el contenido de insulina en los islotes está mermado en los ratones IRS-2^{-/-}. Por tanto, las células β carentes de IRS-2 son incapaces de compensar a la resistencia a insulina y la diabetes se origina. La expresión de IRS-2 se detecta tanto en las células β como en las células ductales del páncreas de animales control, en donde puede estar desempeñando un papel regulador de la proliferación y de la diferenciación de islotes^{86,87}.

A diferencia del fenotipo diabético de los ratones IRS-2^{-/-}, nuestro grupo y otros han mostrado que la delección de IRS-1 en ratones produce sólo una moderada resistencia a insulina sin un deterioro de la homeostasis de glucosa^{78,86}. Sin embargo, el crecimiento pre y posnatal de los ratones IRS-1^{-/-} está fuertemente reducido, lo que sugiere que IRS-1 es un mediador del crecimiento somático. La señalización por insulina es casi normal en el hígado de ratones IRS-1^{-/-}, presu-

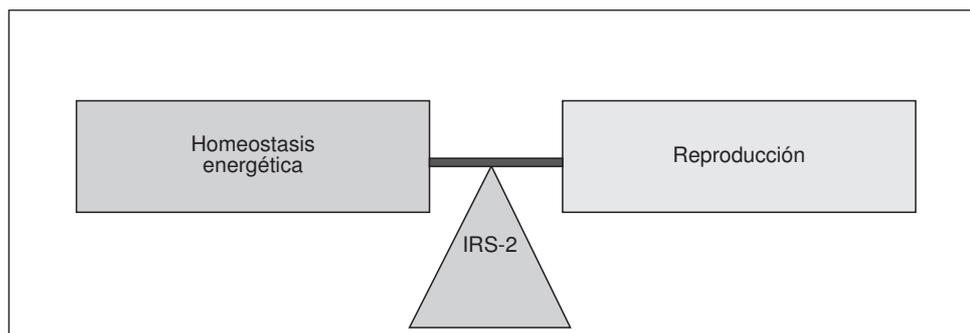


Fig. 2. Las rutas de insulina/IRS-2 constituyen un mecanismo conservado evolutivamente para la integración de las señales metabólicas con las de la reproducción.

miblemente mediada por IRS-2^{78,86}. En gran contraste con la reducción de masa de células β producida por la eliminación de IRS-2, la disrupción del gen IRS-1 aumenta dicha masa celular; los ratones IRS-1^{-/-} poseen un aumento de dos veces en la masa de células β pancreáticas⁸⁶⁻⁸⁸. Esta observación básica provee más evidencias que apuntan al papel de IRS-2 en la diferenciación, crecimiento y/o supervivencia de las células productoras de insulina. Además, sugiere que el balance equilibrado entre la señalización por estas dos moléculas es necesario para la correcta función de las células β .

LAS RUTAS DE SEÑALES MEDIADAS POR IRS-2 REGULAN LA FISIOLÓGIA DE LA REPRODUCCIÓN

El fenotipo diabético resultante de la delección de IRS-2 es sexualmente dimórfico: mientras los machos *knockout* para IRS-2 mueren por complicaciones de la diabetes a partir de las 10 semanas de edad, las hembras carentes de IRS-2 ponen de manifiesto una suave intolerancia a glucosa y no desarrollan una diabetes evidente hasta mucho más tarde (aproximadamente 4 meses de edad). Notablemente, las hembras *knockout* para IRS-2 son infértiles⁵⁸. Para excluir cualquier tipo de influencia del metabolismo diabético en la fisiología de la reproducción, se recogieron datos de nuevos estudios con hembras de menos de 10 semanas de edad, es decir, antes de que comenzara la diabetes. Por tanto, la ausencia de la función reproductiva normal observada en estas hembras IRS-2^{-/-} no podía ser causa directa de las complicaciones de la diabetes.

En apareamientos controlados, diseñados para determinar el grado de fertilidad, sólo el 10% de hembras IRS-2^{-/-} cruzadas con machos control se preñaron y este porcentaje se redujo al 0% cuando las hembras IRS-2^{-/-} se cruzaron con machos IRS-2^{-/-}⁵⁸. Aunque los machos IRS-2^{-/-} tienen una reducida fertilidad, resultan ser reproductores adecuados si se emplean antes de que se inicie la diabetes. También supervisamos estos cruces para detectar la presencia de tapones vaginales como indicador de la copulación y como evidencia indirecta de lordosis. En las hembras *knockout* para IRS-2 casi nunca se evidenciaron tapones a lo largo de este estudio⁵⁸. Muchas hembras IRS-2^{-/-} (71%) carecían de ciclo menstrual, permaneciendo constantemente en fase diestral. Además, las concentraciones en suero de LH, estrógenos, progesterona y testosterona están mermadas en las hembras *knockout* para IRS-2⁵⁸. Normalmente, si se previenen las señales de retroacción hacia el eje hipotalámico-hipófisis-pituitario, como en el caso de la ovariectomización o de la disfunción en el ovario, los valores de LH se elevarían debido a la pérdida de la supresión de hormona liberadora de LH (LHRH) por las hormonas esteroideas². Sin embargo, los

bajos valores de LH medidos en las hembras IRS-2^{-/-} sugieren que esta estimulación recíproca de LH no ocurre en los animales deficientes en IRS-2, apuntando a que otros defectos adicionales en el eje reproductivo están participando del fallo de los ovarios de estos animales.

El análisis del fallo en la reproducción de estos animales reveló que los ovarios de las ratonas IRS-2^{-/-} son pequeños, conteniendo muy pocos folículos superficiales y mostrando un engrosamiento de la *tunica cortex*⁵⁸. Adicionalmente, el examen histológico de secciones de hembras IRS-2^{-/-} a 6, 8 y 12 semanas de edad reveló características típicas de anovulación como el engrosamiento del estroma del ovario y la ausencia de *corpora lutea*. Además, los ovarios adultos contenían un reducido número de folículos primarios con pocos folículos en crecimiento que alcanzaban la fase antral del desarrollo. La cuantificación de oocitos primarios de embriones en el día 18 demostró un menor número de estas células en ovarios IRS-2^{-/-} en comparación con los controles, indicando que la carencia de IRS-2 inhibe la proliferación y/o aumenta la apoptosis en esta población celular durante el desarrollo del ovario. Con ello, estas observaciones demuestran que la delección de IRS-2 tiene profundas consecuencias en la fertilidad de las hembras y sugiere que esta molécula puede estar regulando rutas fisiológicas requeridas para la reproducción del ratón (tabla 1).

LAS RUTAS DE IRS-2 REGULAN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Diversos resultados sugieren que en mamíferos la insulina actúa centralmente regulando el apetito. Por ejemplo, la insulina inyectada directamente en la región hipotalámica del cerebro suprime el apetito^{15,89,90}. El análisis de la ingestión de comida en animales IRS-2^{-/-} demostró que consumen un 30% más de comida que los animales control⁵⁸. Además, este aumento en el consumo de comida se reflejó en anomalías del almacenaje de combustible metabólico. Los ratones IRS-2^{-/-} pesaban sólo un poco más pero almacenaban el doble de grasa que los animales control de la misma edad. Los valores circulantes de leptina eran más de cinco veces superiores en hembras IRS-2^{-/-} de 8 semanas de edad, como cabría esperar a su aumento en la grasa corporal. Además, las concentraciones de leptina eran 2,5 veces superiores a las 4 semanas de edad, antes de que comenzara a manifestarse la anormal tolerancia a glucosa. Los elevados valores de leptina junto con la constante hiperfagia constituyen algunas de las posibles explicaciones para la disregulación de la homeostasis energética en las hembras IRS-2^{-/-}. La resistencia hipotalámica a leptina debido a mutaciones en el receptor de leptina (ratones *db/db*) está asociada a hiperfagia, aumento de peso e infertilidad en las hembras¹¹.

Nuestros resultados sugieren que las rutas de señalización mediadas por IRS-2, quizás en el eje hipotalámico, están involucradas de manera crítica en la regulación del combustible metabólico así como en la fertilidad⁵⁸. La leptina se ha descrito como activadora de algunos componentes de la ruta de señales de la insulina, incluyendo IRS-1 e IRS-2^{91,92}, lo que sugiere la existencia de algunas interacciones funcionales entre estas dos hormonas. La resistencia periférica a insulina en los *knockout* para IRS-2 está muy probablemente acompañada por una pérdida de la sensibilidad a la insulina en regiones críticas del cerebro. Por tanto, estas observaciones implican que la resistencia hipotalámica a la leptina está asociada a la resistencia de la insulina tanto periférica como a nivel del SNC.

LA SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA: UN MECANISMO CONSERVADO EVOLUTIVAMENTE QUE COORDINA EL METABOLISMO Y LA REPRODUCCIÓN

En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, un sistema neurosecretor regula si el animal entrará en el ciclo reproductivo de la vida o si se va a parar en el desarrollo en un estadio de latencia⁹³. Cuando la comida es limitada, los animales jóvenes se aletargan en lugar de desarrollarse al estado adulto^{94,95}. El gen *daf-2* es esencial en la regulación de este proceso de señalización endocrina y codifica una proteína homóloga al receptor de insulina/IGF-I^{96,97}. De modo análogo a la señalización de la insulina en mamíferos, la acción de DAF-2 requiere del gen *age-1* el cual codifica para la PI3K⁹⁸. La ruta de *daf-2* controla tanto el desarrollo reproductivo como la senescencia natural⁹⁹. El desarrollo de mutantes en *daf-2* se bloquea en el estado de letargo de la larva y demuestran un aumento de la longevidad^{94,96,97,100}. El bloqueo de letargo coincide con grandes cambios metabólicos. La señalización de DAF-2 permite el crecimiento reproductivo fuera del letargo, lo que está asociado al empleo de la comida para el crecimiento celular y pequeños almacenes de grasa^{94,96,97,100}. En cambio, el metabolismo de los mutantes *daf-2* cambia de dirección y es dirigido a la producción de grasa y glucógeno en las células intestinales^{96,97}. Estos mutantes entran en latencia y quedan bloqueados en el desarrollo. Por tanto, las señales que emergen de DAF-2 regulan el metabolismo, el crecimiento, el desarrollo reproductivo y la longevidad de este invertebrado. La homología estructural y funcional de DAF-2 con el receptor de insulina de mamíferos nos proporciona el fundamento para considerarlo un mecanismo que integra señales metabólicas con la regulación neuroendocrina de la reproducción y, quizá, con el envejecimiento. El aumento de la longevidad asociado con el descenso de la señalización por DAF-2 es análogo al aumento de la longevidad en mamíferos asociado con la restricción calórica^{95,100,101}.

La conservación evolutiva del sistema de señalización de la insulina y su papel en la coordinación de múltiples sistemas está adicionalmente ilustrado por descubrimientos recientes del gen *chico* en *Drosophila*, el gen homólogo de los IRS-1-4 de vertebrados, el cual sirve de sustrato del receptor de insulina de *Drosophila* y ejerce una función primordial en el control del crecimiento celular, la reproducción y el metabolismo¹⁰². Los animales mutantes en *chico* son la mitad de tamaño que los animales control debido a una reducción en el número y en el tamaño celulares. Curiosamente, *chico* también regula el metabolismo. A pesar del reducido tamaño de los mutantes en *chico*, éstos evidencian dos veces más en contenido lipídico que los animales control¹⁰². Además, las hembras mutantes en *chico* son estériles, lo que sugiere que incluso las moscas poseen un meca-

TABLA 1. Resumen de las características fenotípicas resultantes de la delección de IRS-2

<p>Metabolismo</p> <ul style="list-style-type: none"> Intolerancia a glucosa (suave en las hembras) Hiperinsulinemia (suave en las hembras) Reducción en la masa de células β Resistencia periférica a insulina Hiperfagia Aumento de la grasa corporal Altos valores de leptina <p>Reproducción</p> <ul style="list-style-type: none"> Infertilidad en las hembras Ciclos estrales desregulados Pequeños ovarios anovulados Bajos valores de hormona luteinizante y hormonas esteroideas
--

nismo para coordinar el metabolismo y la reproducción¹⁰².

Con todo ello, tanto en *C. elegans* como en *Drosophila*, los homólogos del sistema de señalizaciones insulina/IGF-I/IRS están implicados no solamente en el mantenimiento de la homeostasis del combustible metabólico sino también en la regulación de la reproducción. De acuerdo con estos descubrimientos en el gusano y en la mosca, nuestras observaciones en el modelo de ratones *knockout* para IRS-2 sugieren que esta ruta de señalización por insulina representa un mecanismo conservado evolutivamente para la regulación de la reproducción y de la homeostasis energética (fig. 2).

BIBLIOGRAFÍA

1. Wade GN, Schneider JE. Metabolic fuels and reproduction in female mammals. *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16: 235-272.
2. Schneider JE, Blum RM, Wade GN. Metabolic control of food intake and estrous cycles in syrian hamsters. I. Plasma insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R476-R485.
3. Schneider JE, Zhou D, Blum RM. Leptin and metabolic control of reproduction. *Horm Behav* 2000; 37: 306-326.
4. Wade GN, Schneider JE, Li HY. Control of fertility by metabolic cues. *Am J Physiol* 1996; 270: E1-E19.
5. Stewart DE. Reproductive functions in eating disorders. *Ann Med* 1992; 24: 287-291.
6. Griffin ML, South SA, Yankov VI, Booth RA, Asplin CM, Veldhuis JD et al. Insulin-dependent diabetes mellitus and menstrual dysfunction. *Ann Med* 1994; 26: 331-340.
7. Haller E. Eating disorders. A review and update. *West J Med* 1992; 157: 658-662.
8. De Souza MJ, Metzger DA. Reproductive dysfunction in amenorrheic athletes and anorexic patients: a review. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23: 995-1007.
9. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269: 546-549.
10. Friedman JM. The alphabet of weight control. *Nature* 1997; 385: 119-120.
11. Friedman JM. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr Rev* 1998; 56: S38-S46; discussion: S54-S75.
12. Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1998; 1: 445-450.
13. Flier J, Maratos-Flier E. Energy homeostasis and body weight. *Curr Biol* 2000; 10: R215-R217.
14. Kennedy JC. The role of the fat depot in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B* 1953; 140: 578-592.
15. Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D et al. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 1999; 848: 114-123.
16. Foster DL, Nagatani S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biol Reprod* 1999; 60: 205-215.
17. Bray GA. Etiology and pathogenesis of obesity. *Clin Cornerstone* 1999; 2: 1-15.
18. Schwartz MW, Kahn SE. Insulin resistance and obesity. *Nature* 1999; 402: 860-861.
19. Venkatesan AM, Dunaif A, Corbould A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: progress and paradoxes. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56: 295-308.

20. Franks S, Gilling-Smith C, Watson H, Willis D. Insulin action in the normal and polycystic ovary. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28: 361-378.
21. Gennarelli G, Holte J, Wide L, Berne C, Lithell H. Is there a role for leptin in the endocrine and metabolic aberrations of polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod* 1998; 13: 535-541.
22. Norman RJ, Clark AM. Obesity and reproductive disorders: a review. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 55-63.
23. Huber-Buchholz MM, Carey DG, Norman RJ. Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1470-1474.
24. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332.
25. Beck B. Neuropeptides and obesity. *Nutrition* 2000; 16: 916-923.
26. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-770.
27. 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: 425-432.
28. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1: 1155-1161.
29. Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y et al. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6957-6960.
30. Cohen SL, Halaas JL, Friedman JM, Chait BT, Bennett L, Chang D et al. Human leptin characterization. *Nature* 1996; 382: 589.
31. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996; 45: 1455-1462.
32. Suresh Y, Das UN. Leptin—the fat controller. *J Assoc Physicians India* 1998; 46: 538-544.
33. Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, Van Bueren A, McCall AL et al. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 1998; 139: 3485-3491.
34. Devos R, Richards JG, Campfield LA, Tartaglia LA, Guisez Y, Van der Heyden J et al. OB protein binds specifically to the choroid plexus of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5668-5673.
35. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 1998; 395: 535-547.
36. Halaas JL, Friedman JM. Leptin and its receptor. *J Endocrinol* 1997; 155: 215-216.
37. Williams G, Harrold JA, Cutler DJ. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 385-396.
38. Malik KF, Young WS 3rd. Localization of binding sites in the central nervous system for leptin (OB protein) in normal, obese (ob/ob), and diabetic (db/db) C57BL/6J mice. *Endocrinology* 1996; 137: 1497-1500.
39. al-Barazanji KA, Buckingham RE, Arch JR, Haynes A, Mossakowska DE, McBay DL et al. Effects of intracerebroventricular infusion of leptin in obese Zucker rats. *Obes Res* 1997; 5: 387-394.
40. Seeley RJ, Van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA et al. Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res* 1996; 28: 664-668.
41. Tritos NA, Elmquist JK, Mastaitis JW, Flier JS, Maratos-Flier E. Characterization of expression of hypothalamic appetite-regulating peptides in obese hyperleptinemic brown adipose tissue-deficient (uncoupling protein-promoter-driven diphtheria toxin A) mice. *Endocrinology* 1998; 139: 4634-4641.
42. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269: 543-546.
43. Woods AJ, Stock MJ. Leptin activation in hypothalamus. *Nature* 1996; 381: 745.
44. Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-543.
45. Moon BC, Friedman JM. The molecular basis of the obese mutation in ob2J mice. *Genomics* 1997; 42: 152-156.
46. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84: 491-495.
47. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83: 1263-1271.
48. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 1996; 14: 95-97.
49. Magni P, Motta M, Martini L. Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regul Pept* 2000; 92: 51-56.
50. Chehab FF. The reproductive side of leptin. *Nat Med* 1997; 3: 952-953.
51. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997; 138: 1190-1193.
52. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; 12: 318-320.
53. Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature* 2000; 404: 632-634.
54. Bronson FH, Marsteller FA. Effect of short-term food deprivation on reproduction in female mice. *Biol Reprod* 1985; 33: 660-667.
55. Bronson FH, Heideman PD. Short-term hormonal responses to food intake in peripubertal female rats. *Am J Physiol* 1990; 259: R25-R31.
56. Hileman SM, Pierroz DD, Flier JS. Leptin, nutrition, and reproduction: timing is everything. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 804-807.
57. Schneider JE, Goldman MD, Tang S, Bean B, Ji H, Friedman MI. Leptin indirectly affects estrous cycles by increasing metabolic fuel oxidation. *Horm Behav* 1998; 33: 217-228.
58. Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Toverly HH et al. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 2000; 407: 377-382.
59. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275: 38990-38994.
60. Farooqi S, Rau H, Whitehead J, O'Rahilly S. ob gene mutations and human obesity. *Proc Nutr Soc* 1998; 57: 471-475.
61. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999; 341: 879-884.
62. O'Rahilly S. Life without leptin. *Nature* 1998; 392: 330-331.
63. Franks S, Mason H, White D, Willis D. Etiology of anovulation in polycystic ovary syndrome. *Steroids* 1998; 63: 306-307.
64. Nestler JE, Jakubowicz DJ, De Vargas AF, Brik C, Quintero N, Medina F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2001-2005.
65. Zhao J, Taverne MA, Van Der Weijden GC, Bevers MM, Van Den Hurk R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 287-296.
66. Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, McKinley MJ, Figdor R, Allen AM et al. Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 1987; 121: 1562-1570.
67. Unger JW, Betz M. Insulin receptors and signal transduction proteins in the hypothalamo-hypophyseal system: a review on morphological findings and functional implications. *Histol Histopathol* 1998; 13: 1215-1224.
68. Unger JW, Lange W. Insulin receptors in the pituitary gland: morphological evidence for influence on opioid peptide-synthesizing cells. *Cell Tissue Res* 1997; 288: 471-483.
69. Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 1979; 282: 503-505.
70. Baskin DG, Figlewicz DP, Woods SC, Porte D Jr, Dorsa DM. Insulin in the brain. *Annu Rev Physiol* 1987; 49: 335-347.
71. Foster LA, Ames NK, Emery NS. Food intake and serum insulin responses to intraventricular infusions of insulin and IGF-I. *Physiol Behav* 1991; 50: 745-749.
72. Woods SC, Stein LJ, McKay LD, Porte D Jr. Suppression of food intake by intravenous nutrients and insulin in the baboon. *Am J Physiol* 1984; 247: R393-R401.
73. Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Schwartz MW. Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes* 2000; 49: 1525-1533.
74. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000; 289: 2122-2125.
75. Kahn CR, Folli F. Molecular determinants of insulin action. *Horm Res* 1993; 39: 93-101.
76. Myers MG, White MF. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 615-658.
77. White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40 Suppl 2: S2-S17.
78. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, Johnson RS et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994; 372: 186-190.
79. Sun XJ, Pons S, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Burks D et al. The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 251-262.
80. Liu SC, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J Biol Chem* 1999; 274: 18093-18099.

81. Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997; 272: 11439-11443.
82. Smith-Hall J, Pons S, Patti ME, Burks DJ, Yenush L, Sun XJ et al. The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry* 1997; 36: 8304-8310.
83. Fantin VR, Lavan BE, Wang Q, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG et al. Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology* 1999; 140: 1329-1337.
84. Fantin VR, Keller SR, Lienhard GE, Wang LM. Insulin receptor substrate 4 supports insulin- and interleukin 4-stimulated proliferation of hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 718-723.
85. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997; 272: 21403-21407.
86. Withers DJ, Gutiérrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391: 900-904.
87. Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 1999; 23: 32-40.
88. Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 2000; 105: 199-205.
89. Schwartz MW. Biomedicine. Staying slim with insulin in mind. *Science* 2000; 289: 2066-2067.
90. Woods SC, Chávez M, Park CR, Riedy C, Kaiyala K, Richardson RD et al. The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1996; 20: 139-144.
91. Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp EHaring HU. Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK- 2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia* 1997; 40: 1358-1362.
92. Szanto I, Kahn CR. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2355-2360.
93. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 1997; 389: 994-999.
94. Apfeld J, Kenyon C. Cell nonautonomy of *C. elegans daf-2* function in the regulation of diapause and life span. *Cell* 1998; 95: 199-210.
95. Sze JY, Victor M, Loer C, Shi Y, Ruvkun G. Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* 2000; 403: 560-564.
96. Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C. The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995; 141: 1399-1406.
97. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; 277: 942-946.
98. Paradis S, Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* 1998; 12: 2488-2498.
99. Hsin H, Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* 1999; 399: 362-366.
100. Tissenbaum HA, Ruvkun G. An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1998; 148: 703-717.
101. Wolkow CA, Kimura KD, Lee MS, Ruvkun G. Regulation of *C. elegans* life-span by insulin-like signaling in the nervous system. *Science* 2000; 290: 147-150.
102. Bohni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andrus BF et al. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 1999; 97: 865-875.