

## Potenciación de la respuesta insulínica a una sobrecarga oral de glucosa en ratas Zucker obesas tratadas con oleoil-estrone

C. CABOT, M. ESTEVE, M.M. GRASA, R. VILÀ, C. ADÁN, J.A. FERNÁNDEZ-LÓPEZ, X. REMESAR y M. ALEMANY

Centre de Recerca en Nutrició i Ciència dels Aliments. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Barcelona.

### POTENTIATION OF INSULIN RESPONSE TO AN ORAL GLUCOSE LOAD IN OBESE ZUCKER RATS TREATED WITH OLEOYL-ESTRONE

**Antecedentes.** La administración de oleoil-estrone induce la pérdida de peso en ratas preservando la glucemia y disminuyendo los valores de insulina.

**Métodos.** Se utilizaron ratas Zucker con normopeso y obesas tratadas crónicamente con 3,5  $\mu\text{mol/kg/día}$  de oleoil-estrone i.v. comparadas con controles que sólo recibieron el excipiente. Se administró (tras 12 h de ayuno) a todos los animales una sobrecarga oral de 3,5 g/kg de glucosa, valorándose acto seguido las concentraciones de glucosa e insulina durante 1 h. También se midieron los valores basales de leptina y estrone total plasmática.

**Resultados.** En las ratas con normopeso, el efecto del tratamiento previo con oleoil-estrone se tradujo en una mayor elevación de la insulinemia y una más rápida recuperación de la glucemia en comparación con los controles. En ratas obesas, la oleoil-estrone indujo una más rápida recuperación de la glucemia y un fuerte incremento de la insulina como respuesta a la sobrecarga de glucosa.

**Conclusiones.** Estos datos sugieren que la oleoil-estrone potencia la respuesta insulínica a la glucosa.

**Background.** Oleoyl-estrone administration induces the loss of body weight in rats, maintaining glucose concentrations and decreasing insulin levels.

**Methods.** Normal weight and obese Zucker rats chronically treated with i.v. oleoyl-estrone, 3.5  $\mu\text{mol/kg/day}$  were used and compared with controls receiving only the vehicle. All animals received an oral load of 3.5 g glucose/kg; then, the levels of insulin and glucose were measured for 1 h. Basal leptin and total estrone levels in plasma were also measured.

**Results.** In normal-weight rats, the oleoyl-estrone treatment resulted in higher insulin levels and faster recovery of glucose levels in comparison with controls. In the obese rats, oleoyl-estrone treatment induced a faster recovery of glucose levels and a marked increase in insulin levels under the glucose load challenge.

**Conclusions.** These data suggest that oleoyl-estrone enhances the insulin response to glucose.

**Key words:** Oleoyl-estrone. Insulin. Zucker rat.

La rata Zucker fa/fa es un modelo de obesidad muy utilizado<sup>1</sup> que se caracteriza por la resistencia a la insulina<sup>2</sup>, que en mayor o menor grado afecta a los diversos tipos de obesidad. Esta resistencia va acompañada de alteraciones en los lípidos plasmáticos<sup>3</sup>, como consecuencia de una inadecuada metabolización de los triacilglicerolos. La obesidad también conlleva un aumento de las concentraciones de leptina circulante<sup>4</sup> con el desarrollo de resistencia a la leptina inducida en parte por glucocorticoides<sup>5</sup>. Los valores de ambas hormonas están relacionados, de modo que la hiperleptinemia va acompañada de resistencia a la insulina<sup>6</sup>.

La oleoil-estrone es una hormona producida por el tejido adiposo<sup>7</sup> bajo el control de la leptina<sup>8</sup> que modula el ajuste del lipostato<sup>9</sup> y que, administrada en dosis farmacológicas a animales experimentales, induce un descenso de la expresión del gen *lep*, un incremento de los valores de glucocorticoides y un descenso de los de leptina e insulina<sup>10</sup>. Estos cambios se producen en condiciones de mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y un ambiente de notable lipólisis y utilización de lípidos

Correspondencia: Dra. M. Alemany.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultat de Biologia.  
Universitat de Barcelona.  
Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.  
Correo electrónico: alemany@bio.ub.es

**Palabras clave:** Oleoil-estrone. Insulina. Rata Zucker.

Manuscrito recibido el 12-3-2001; aceptado para su publicación el 5-11-2001.

como sustrato energético<sup>10</sup> con disminución de la ingesta y mantenimiento del gasto energético<sup>11</sup>, lo que comporta una rápida pérdida de reservas grasas que es dependiente de la dosis de oleoil-estrona administrada<sup>7</sup>.

En este estudio hemos intentado determinar si el tratamiento crónico con oleoil-estrona modifica la respuesta insulínica a una sobrecarga de glucosa oral en ratas normales y genéticamente obesas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Zucker hembra con normopeso (Fa/?) y obesas (fa/fa) de 8 semanas. Los animales se mantuvieron en jaulas colectivas en condiciones ambientales y de alimentación estándares. Se establecieron dos grupos de ratas con normopeso y dos más de ratas obesas (controles y tratadas). Al inicio del experimento se implantó a todos los animales una minibomba osmótica (modelo 2ML2; de Alzet, Palo Alto CA, EE.UU.) bajo la piel del dorso, conectada mediante un corto capilar de polietileno (PE 10; de Becton Dickinson, Parsippany, NJ, EE.UU.) a la vena yugular izquierda. La minibomba contenía 2 ml de una suspensión de 200 g/l de triacilglicérolas (con fosfolípidos como agente emulsionante) en solución isotónica. El contenido de la minibomba se vertía a la circulación de modo continuo a una tasa de 2  $\mu$ l/h durante 14 días. Los grupos controles (normopeso y obesas) se infundieron sólo con la suspensión lipídica, mientras que los grupos tratados (normopeso y obesas) se infundieron con la suspensión de lípido en el que se había disuelto suficiente oleoil-estrona (Salvat, Esplugues de Llobregat, España) para que la dosis diaria administrada a los animales fuera de 3,5  $\mu$ mol/kg<sup>7</sup>.

El día 14 tras la implantación de las minibombas, se insertó una nueva cánula en la carótida derecha, bajo anestesia con éter etílico. Al día siguiente, a las 12 h de la canulación (en que los animales no tuvieron acceso a la comida), y una vez recuperados los animales, se les administró una carga oral de glucosa de 3,5 g/kg de rata (20 mmol/kg) en 1,5 ml de agua mediante sonda gástrica. A intervalos de 0, 10, 20, 30 y 60 min se extrajeron muestras de unos 150  $\mu$ l de sangre por la sonda capilar. Al acabar el experimento, los animales fueron sacrificados.

Las muestras de sangre se utilizaron para obtener plasma, del que se separaron alícuotas para la determinación de insulina (*rat insulin kit* de Amersham; Amersham, Reino Unido) y glucosa tras desproteinizarlo con perclorato (Trinder-glucose; Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). De las muestras del minuto 60, de mayor volumen, se obtuvieron alícuotas para la medida de los valores de leptina (RL 83K; Linco; St. Charles, MO, EE.UU.) y estrona total (acil-estrona)<sup>12</sup>.

Los resultados se han expresado en todos los casos como la media  $\pm$  error estándar, y corresponden a 5 animales por grupo. La significación estadística de las diferencias entre grupos se evaluó mediante ANOVA o la prueba de la t de Student.

## RESULTADOS

A lo largo de los 14 días de tratamiento, los animales control ganaron peso y los tratados con oleoil-estrona lo perdieron. Las ratas con normopeso pasaron de 218  $\pm$  6 a 225  $\pm$  6 g, con un aumento del 3,2  $\pm$  1,4% (controles), y de 214  $\pm$  5 a 203  $\pm$  4 g, con una disminución del 5,1  $\pm$  2,3% (tratadas); las ratas obesas pasaron de 418  $\pm$  12 a 447  $\pm$  12 g, con un aumento del 7,2  $\pm$  1,2% (controles), y de 392  $\pm$  9 a 355  $\pm$  10 g, con una disminución del 9,4  $\pm$  2,8% (tratadas). En ambos grupos (ratas con normopeso y obesas) el tratamiento con oleoil-estrona provocó diferencias significativas (t de Student) con respecto a los controles en el peso final de los animales.

Los valores de glucosa e insulina a lo largo del experimento de sobrecarga se detallan en la figura 1. En las ratas con normopeso, la glucemia se incrementó más rápidamente, y se recuperó antes en el grupo tratado con oleoil-estrona que en los controles, aunque las diferencias fueron poco relevantes; se observó también una respuesta insulínica más

marcada en el grupo tratado. En las ratas obesas, la glucemia subió menos y se normalizó antes en el grupo tratado que en los controles. Paralelamente, en los animales obesos control los elevados valores de insulina apenas presentaron cambios con el tiempo, pero las ratas tratadas experimentaron una fuerte subida en espiga, con un máximo a los 10 min. La curva de insulinemia de los animales tratados se mantuvo por encima del de los controles a lo largo de todo el período estudiado.

En la tabla 1 se presentan los valores de leptina y estrona total –esencialmente acil-estrona<sup>13</sup>–; no se observan diferencias por efecto del tratamiento con oleoil-estrona en los valores de leptina, aunque las ratas obesas presentan una clara hiperleptinemia. Los valores de estrona total presentaron un fuerte incremento, como consecuencia de la administración de la hormona en ambas series, sin que se apreciaran diferencias entre ratas con normopeso y obesas.

## DISCUSIÓN

El tratamiento con oleoil-estrona indujo una clara pérdida de peso en los animales, que contrasta con los incrementos de los controles y que está de acuerdo con los efectos del éster sobre las reservas grasas de ratas normales<sup>7</sup> y genéticamente obesas<sup>14</sup>. A partir de datos previos podemos asumir que esta pérdida de peso corresponde esencialmente a grasa, con preservación de la masa proteica de los animales<sup>7,11</sup>.

La rata Zucker obesa manifiesta una clara resistencia a la insulina<sup>1</sup>, por lo que ha sido utilizada en ocasiones como modelo experimental de diabetes tipo 2<sup>15</sup>, ya que tiende a manifestar una glucemia normal o débilmente incrementada con una notable hiperinsulinemia<sup>1</sup>. Esta situación se complica por una fuerte hiperleptinemia<sup>4</sup>, debida a la resistencia a la leptina provocada por la casi nula funcionalidad del receptor de leptina de estos mutantes<sup>16</sup>. La ausencia de variación en los valores de leptina en la sangre de ratas con normopeso control y tratadas está en contradicción con la inhibición por la oleoil-estrona<sup>10</sup> de la expresión del gen *lep* que codifica la leptina en tejido adiposo blanco. Este efecto tampoco se observa en las ratas fa/fa, aunque en éstas la oleoil-estrona no afecta a la expresión del gen *lep* por ser necesaria la integridad del receptor de la leptina para que se pueda producir el efecto inhibitor<sup>17</sup>.

Los efectos del tratamiento con oleoil-estrona en ratas con normopeso, en cuanto a la respuesta glucémica e insulínica a una sobrecarga oral de glucosa, no son cuantitativamente importantes aunque se aprecia una potenciación clara de la respuesta insulínica y un cambio en la forma de la curva de glucemia: hay una más rápida absorción de glucosa y una normalización de la glucemia más rápida en los animales tratados.

En las ratas obesas, los efectos son más patentes: la respuesta insulínica a la administración de glucosa es mucho mayor, más clara y sostenida en los animales tratados, lo que conduce a un evidente aplanamiento de la curva de glucemia con un acercamiento más rápido a los valores basales de glucosa. Cabe señalar que los valores basales registrados, tanto de insulina como de glucosa, están claramente influidos por la situación de ayuno relativo al que han estado sometidos los animales, lo que tiende a normalizar la hiper-glucemia basal típica de las ratas Zucker fa/fa.

A medio y largo plazo, la oleoil-estrona disminuye los valores de insulina circulante en ratas normales<sup>10</sup> y obesas<sup>9</sup>, manteniendo la glucemia y disminuyendo la resistencia a la insulina. A corto plazo, una respuesta insulínica más clara tras la administración de la carga de glucosa, indica que el tratamiento con oleoil-estrona también aumenta la sensibili-

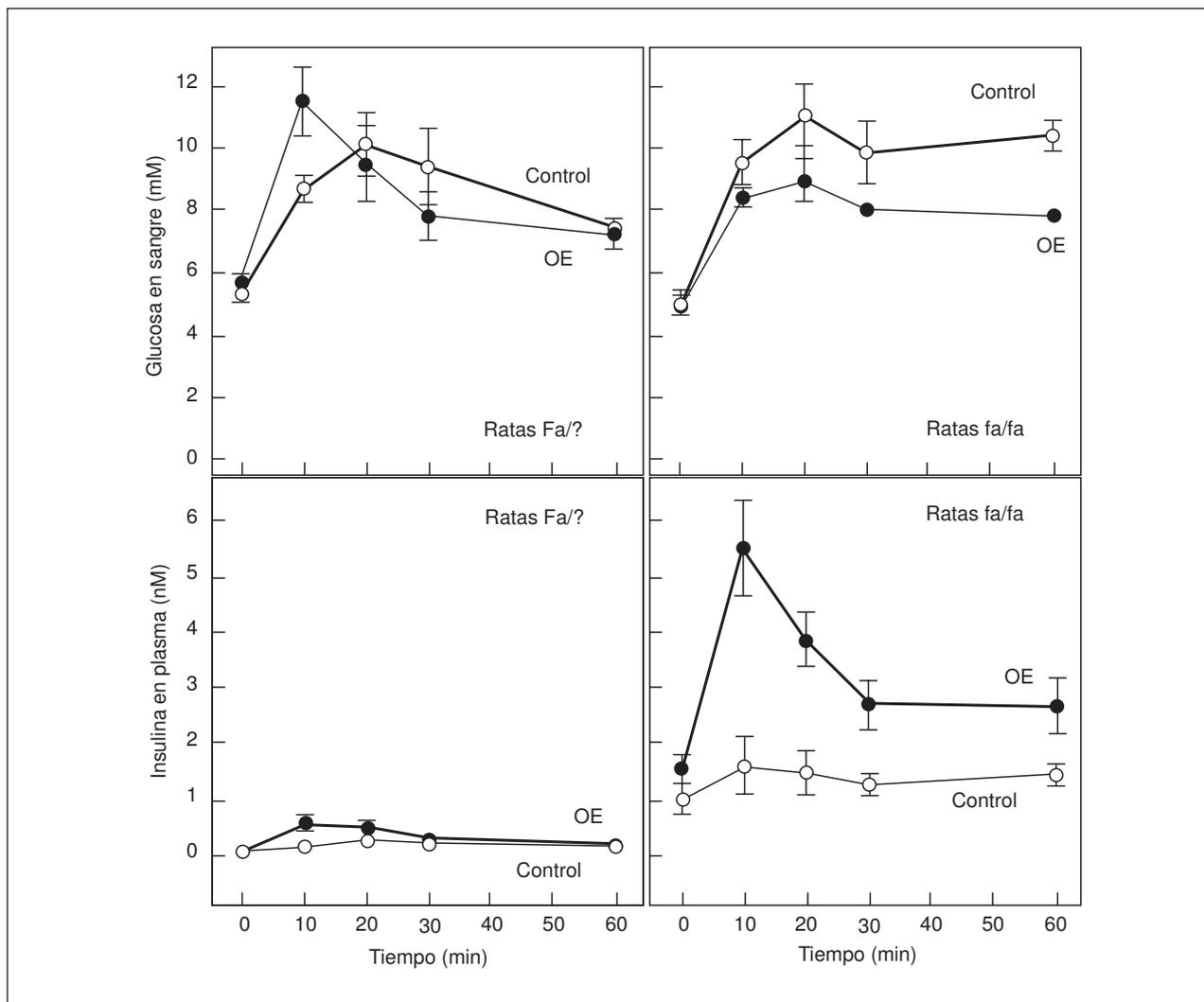


Fig. 1. Variación de los valores plasmáticos de glucosa e insulina en ratas Zucker con normopeso (Fa/?) y genéticamente obesas (fa/fa) tratadas crónicamente con oleoil-estrona i.v. en suspensión lipídica. Control: ratas que recibieron sólo la suspensión lipídica; OE: ratas que recibieron la suspensión suplementada con 3,5  $\mu\text{mol/kg/d}$  de oleoil-estrona. Significación estadística de las diferencias entre los grupos control y tratado con oleoil-estrona (ANOVA): glucosa normopeso ( $p = 0,426$ ), glucosa obesas ( $p = 0,000$ ), insulina normopeso ( $p = 0,001$ ), insulina obesas ( $p = 0,000$ ).

**TABLA 1. Valores de leptina y estrona total en el plasma de ratas Zucker Fa/? y fa/fa tratadas con oleoil-estrona**

Parámetro	Normopeso (Fa/?)		Obesas (fa/fa)	
	Control	Tratadas	Control	Tratadas
Leptina (nM)	1,68 $\pm$ 0,28	1,41 $\pm$ 0,22	58,7 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	59,4 $\pm$ 12,4 <sup>a</sup>
Estrona total (nM)	141 $\pm$ 11	2.399 $\pm$ 218 <sup>b</sup>	169 $\pm$ 10	1.998 $\pm$ 866 <sup>b</sup>

Los valores presentados son la media  $\pm$  error estándar de 5 animales por grupo, medidos a los 60 min de la sobrecarga de glucosa. Significación estadística de las diferencias entre los grupos (t de Student): <sup>a</sup> $p < 0,05$  entre ratas tratadas y controles; <sup>b</sup> $p < 0,05$  entre los animales obesos y los que tenían normopeso.

dad del páncreas a la glucosa, de modo que se potencia la respuesta insulínica. Estos resultados demuestran que la oleoil-estrona probablemente actúa sobre más de un punto del sistema insulínico.

**AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación fue subvencionada por Laboratorios Salvat, S.A., de Esplugues de Llobregat, y por los proyectos BIO98-0316 y 2FD97-0233 del MEC.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Kasiske BL, Odonell MP, Keane WF. The Zucker rat model of obesity insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 1992;19(Suppl 1):1110-15.
2. Kemmer FW, Berger M, Herberg L, Gries FA, Wirdeier A, Becker K. Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Demonstration of insulin resistance in the obese Zucker rat. *Biochem J* 1979;178:733-41.
3. Schonfeld G, Felski C, Howald MA. Characterization of the plasma lipoproteins of the genetically obese hyperlipoproteinemic Zucker fatty rat. *J Lipid Res* 1974;15:457-63.
4. Pagano C, Englaro P, Granzotto M, Blum WF, Sagrillo E, Ferretti E, et al. Insulin induces rapid changes of plasma leptin in lean but not in genetically obese (fa/fa) rats. *Int J Obes* 1997;21:614-8.
5. Ur E, Grossman A, Després JP. Obesity results as a consequence of glucocorticoid induced leptin resistance. *Horm Metabol Res* 1996;28:744-7.
6. Remesar X, Rafecas I, Fernández-López JA, Alemany M. Is leptin an insulin counter-regulatory hormone? *FEBS Lett* 1997;402:9-12.
7. Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, et al. Oleoil-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obesity* 1996;20:588-94.
8. Esteve M, Virgili J, Aguilar H, Balada F, Fernández-López JA, Remesar X, et al. Leptin enhances the synthesis of oleoil-estrone from estrone in white adipose tissue. *Eur J Nutr* 1999;38:99-104.
9. Adán C, Cabot C, Esteve M, Grasa MM, Masanés R, Vilà R, et al. Oleoil-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and in obese Zucker rats. *Int J Obesity* 1999;22:366-73.
10. Sanchis D, Adán C, Ardèvol A, Grasa MM, Cabot C, Balada F, et al. Short-term treatment with oleoil-estrone in liposomes (Merlin-2) strongly reduces the expression of the ob gene in young rats. *Biochem J* 1997;326:357-60.
11. Sanchis D, Balada F, Picó C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, et al. Rats receiving the slimming agent oleoil-estrone in liposomes Merlin-2; decrease food intake but maintain thermogenesis. *Arch Physiol Biochem* 1997;105:663-72.
12. Ardèvol A, Virgili J, Sanchis D, Adán C, Fernández-Real JM, Fernández-López JA, et al. A method for the measurement of plasma estrone fatty ester levels. *Anal Biochem* 1997;249:247-50.
13. Virgili J, Casals I, Peinado J, Esteve M, Julve J, Fernández-López JA, et al. Distribution of oleoil-estrone in rat plasma lipoproteins. *Horm Metabol Res* 1999;31:597-601.
14. Balada F, Sanchis D, Grasa MM, Virgili J, Estruch J, Fernández-López JA, et al. Effect of the slimming agent oleoil-estrone in liposomes on the body weight of Zucker obese rats. *Int J Obesity* 1997;21:789-895.
15. Plotkin BJ, Paulson D. Zucker rat (fa/fa), a model for the study of immune function in type-II diabetes mellitus: effect of exercise and caloric restriction on the phagocytic activity of macrophages. *Lab Anim Sci* 1996;46:682-4.
16. Chua SC, Chug WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, et al. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the ob, leptin receptor. *Science* 1996;271:994-6.
17. Adán C, Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Vilà R, Massanés RM, et al. Short-term treatment with oleoil-estrone in liposomes (Merlin-2) does not affect the expression of the ob gene in Zucker obese rats. *Mol Cell Biochem* 1999;197:109-15.