

Dieta obesogénica y estreptozotocina: un modelo *in vivo* de diabetes tipo 2

AA Becerril-Campos¹ y SMAhumada-Solórzano¹

Resumen

La acumulación excesiva y anormal de tejido adiposo es un proceso de inflamación crónica, que da lugar a resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (Dm2), segunda causa de muerte en México. Para contribuir al entendimiento de la fisiopatología y desarrollar tratamientos cuya inocuidad no ha sido probada aún en humanos, es necesaria la utilización de modelos biológicos en animales. En nuestro grupo de trabajo, desarrollamos un modelo *in vivo* de diabetes mellitus tipo 2 en rata Wistar, para lo cual utilizamos modificaciones en la dieta y un fármaco inductor de diabetes (estreptozotocina). Durante 6 semanas, los animales consumieron una dieta obesogénica (20% manteca animal, 20% fructosa, 0.15% colato), con y sin estreptozotocina (40 mg/kg), y se usó como control una dieta estándar. La dieta obesogénica (DO) mostró un incremento en las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, cVLDL y triacilglicéridos; el grupo DO+ estreptozotocina generó hiperglicemia e índice HOMA-IR relacionados con RI, un cuadro de dislipidemia común en obesidad ó DM2, así como una disminución en cHDL, mientras que en tejido adiposo visceral se encontró disminuida la glucosa y acumulación de triacilglicéridos. Por lo tanto, este modelo es ideal para el estudio de diabetes mellitus tipo 2 y tiene potencial para analizar blancos terapéuticos sobre esta patología.

Palabras clave: obesidad, diabetes mellitus tipo 2, resistencia a la insulina, estreptozotocina

¹ Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

Fecha de recepción: 09 de mayo de 2018

Fecha de aceptación: 10 de agosto de 2018

Abstract

Abnormal or excessive fat accumulation and chronic inflammation lead to insulin resistance and type 2 diabetes, the second cause of death in Mexico. Animal models are useful to contribute to the understanding of pathophysiology and to be able to develop new treatments whose safety hasn't been tested for human consumption. Our working group develop an animal model for type 2 diabetes and obesity, using dietary modifications and a diabetes-inducing drug (streptozotocin) in Wistar rats. For 6 weeks the animals consumed an obesogenic diet (20% saturated fat, 20% fructose, 0.15% sodium cholate), with or without streptozotocin (40 mg/kg), versus a standard diet as a control. The obesogenic diet (OD) showed an increase in serum glucose, total cholesterol, VLDLc and triacylglycerides. The OD + streptozotocin group generated a hyperglycemia and HOMA-IR index related to RI and dyslipidemia, common in DM2. On the other hand, this treatment decreased HDLc, and increased triacylglycerides in visceral adipose tissue. Therefore, our model is ideal for the study of type 2 diabetes mellitus and has the potential to analyze therapeutic targets for this pathology.

Key words: obesity, type 2 diabetes, insulin resistance, streptozotocin

Introducción

La obesidad, acumulación anormal y excesiva del tejido adiposo, es un proceso inflamatorio crónico que promueve el desarrollo de comorbilidades, dentro de las que se pueden destacar: resistencia a la insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, así como algunos tipos de cáncer (Blüher, 2016; Gómez-Hernández, Beneit, Díaz-Castroverde y Escribano, 2016). La RI es la incapacidad de la insulina para realizar cualquiera de sus funciones, incluida la internalización de glucosa por la célula (Robinson, Hegyi, Hannun, Buse y Sethi, 2014), mientras que la diabetes es un estado de hiperglicemia crónico, ya sea por RI o por menor secreción/producción de la insulina (Kerner, Brückel y Kerner, 2014), aunado a comorbilidades asociadas.

Dentro de los modelos animales de estudio para el desarrollo de estrategias y el entendimiento de la fisiopatología de la obesidad, RI y DM2, el uso de

dietas altas en grasa, en combinación con colato de sodio, sucralosa o fructosa y una baja dosis de estreptozotocina, es una opción que requiere un bioterio y personal menos especializado, como aquellos basados en animales transgénicos. Este modelo trata de simular, en mayor medida, lo que sucede en los humanos, en donde la sobrealimentación favorece el desarrollo de obesidad y sus comorbilidades (Olivares et al., 2017).

Una dieta alta en grasa (58% de lípidos) ha mostrado causar hiperlipidemia y disfunción del corazón, vasos sanguíneos e hígado (Jamshed, Arslan y Gilani, 2014). La inclusión de colato de sodio (sal biliar) en nuestro modelo favorece la absorción de lípidos (Jamshed et al., 2014), sin importar la falta de vesícula biliar en las ratas (Higashiyama et al., 2018); la sucralosa o la fructosa promueven resistencia a la leptina (mayor consumo de alimento y ganancia de peso) (Lin, Shen, Hsu y Lin, 2017). La estreptozotocina (STZ, derivado de *Streptomyces achromogenes*) es un agente citotóxico para el que son blanco las células β pancreáticas. Altas dosis (>65 mg/kg) de STZ de forma repetida han permitido utilizarlo como inductor de diabetes tipo I; sin embargo, en bajas dosis, en conjunto con una dieta alta en grasa, produce un modelo con hiperglicemia, hiperinsulinemia y RI, y no está del todo claro si puede propiciar momentos tempranos o tardíos de la DM2 (Furman, 2015; Skovso, 2014).

La DM2 es la segunda causa de muerte en México, por lo que es de vital importancia sumar esfuerzos en la búsqueda de estrategias para prevenir, diagnosticar y tratarla oportunamente; en este proyecto, proponemos un modelo animal de diabetes tipo 2 desarrollado en un corto plazo y con una inyección de STZ, en conjunto con una dieta alta en grasa animal y carbohidratos simples.

MÉTODO

Modelo experimental. Durante 6 semanas de tratamiento, 24 ratas Wistar macho (5 semanas de edad) se mantuvieron en condiciones controladas (22°C, 60% humedad, ciclo luz/oscuridad de 12 h), con alimentación y agua *ad libitum*. El protocolo y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias

Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (51FCN2016).

Los animales se dividieron aleatoriamente, con respecto de su peso (296.5 ± 3.5 g), en 3 grupos: 1) dieta estándar (DE), alimento Rodent Lab Chow 5001®; 2) dieta obesogénica (DO), DE + 20% fructosa + 20% lípidos (grasa de origen animal) + 0.15% de colato de sodio; n=8 ratas por grupo. A los grupos DE y DO se les aplicó una inyección intraperitoneal de buffer de citratos, 0.1M, pH 7.2 (vehículo). Finalmente: 3) dieta obesogénica + estreptozotocina (DO+STZ), que consistió en la DO previamente descrita, con una administración intraperitoneal de 40 mg/kg de peso de STZ diluida en el vehículo. La STZ y el vehículo fueron administrados en la tercera semana del tratamiento. Se registró cada semana el peso de las ratas.

Determinación de parámetros metabólicos. La eutanasia fue por decapitación y el suero para la determinación de los parámetros metabólicos fue obtenido por centrifugación de la sangre colectada.

Las variables metabólicas en suero fueron: glucosa, colesterol total, cHDL y triacilglicéridos con reactivos Spinreact® en el equipo Mindray® bs-120. Se calculó el índice HOMA-IR, cLDL y cVLDL. La insulina se determinó con el kit Rat Ins1/Insulin RAB0904 de Sigma® en el lector de placas Spectramax-250®.

Análisis estadístico. Los datos se presentan como medias \pm desviación estándar, comparados mediante ANOVA con *post hoc* de Tukey, con significancia estadística $p \leq 0.05$. Se utilizó IBM SPSS Statistics, versión 23 gratuito, y GraphPad Prism, versión 5.

Resultados

Al inicio del experimento, las ratas presentaron un peso promedio de 296.5 ± 3.5 g; en la segunda semana, la ganancia de peso en las ratas con DO+ STZ fue significativamente mayor (figura 1) que en los otros grupos (26 g); sin embargo, después de 6 semanas de tratamiento, no hubo diferencias significativas. En las ratas tratadas con dieta estándar (DE), se observó una ganancia de peso de 136.2 ± 7.3 g, mientras que en DO y con STZ (DO+STZ) fue de 164.8 ± 31.4 g y 141.5 ± 38.6 g, respectivamente.

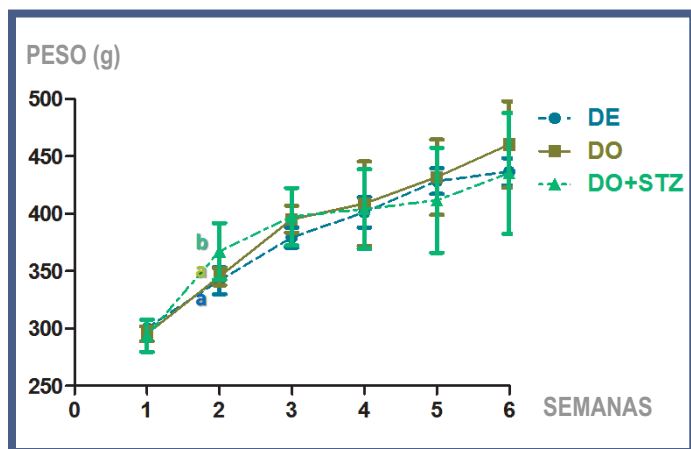


Figura 1. Peso en ratos macho Wistar tratadas con dieta obesogénica y estreptozotocina. Las ratas fueron pesadas semanalmente por duplicado. Se presentan los datos como media \pm desviación estándar. Se compararon medias con ANOVA *post hoc* Tukey, letras diferentes $p \leq 0.05$; DE: dieta estándar; DO: dieta obesogénica; DO+STZ: dieta

Antes de la administración de STZ o vehículo, las ratas presentaron, en ayuno de 6 h, una concentración de 107.5 ± 5.0 mg de glucosa. En la semana 6 (tabla 1), con la DO+STZ, la glucosa subió a 278.4 mg (161%), lo que sugiere hiperglicemia. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a insulina 8.8 y 14.2 $\mu\text{UI/mL}$, respectivamente. Al calcular el índice HOMA-IR, encontramos en DE valores normales de 3.8 ± 0.03 , mientras que en DO hubo un incremento de 34.2%; es decir, los animales con DO requirieron mayor cantidad de insulina que aquellos con DE para mantener las concentraciones de glucosa sérica normal; por otro lado, con DO+STZ, el HOMA-IR subió 118.4%, casi a la par de la glucosa (hiperglicemia), y las concentraciones de insulina fueron incapaces de mantener la glucemia estable (resistencia a la insulina).

Además, observamos cambios en el perfil de lípidos (tabla 1), donde la DO aumentó los triacilglicéridos séricos a 95 mg/dL y DO+STZ a 191.4 mg/dL; el colesterol total a 49.6 y 77.1 mg/dL; la lipoproteína de baja densidad (LDL) a 26.8 y 47.1 mg/dL; la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) a 19 y 24.4 mg/dL, respectivamente. La DO+STZ disminuyó 6.1 mg/dL la lipoproteína HDL, sin modificaciones significativas en la DO sin STZ. Estos datos sugieren una dislipidemia clásica de diabetes mellitus tipo 2.

En el tejido adiposo visceral, tras analizar las concentraciones de triacilglicéridos y glucosa (figura 2),

	DE n=8	DO n=8	DO + STZ n=8
Glucosa (mg/dL)	147.8 \pm 4.3 ^a	154.3 \pm 17.5 ^a	385.9 \pm 167.8 ^b
Insulina ($\mu\text{UI/mL}$)	10.5 \pm 0.1 ^a	12.4 \pm 1.8 ^a	9.7 \pm 0.9 ^a
HOMA-IR	4.3 \pm 0.4 ^a	4.5 \pm 0.7 ^a	9.9 \pm 4.3 ^b
Colesterol (mg/dL)	66.4 \pm 7.0 ^a	116.0 \pm 8.5 ^{a,b}	143.8 \pm 67.9 ^b
Triacilglicéridos (mg/dL)	134.6 \pm 32.4 ^a	229.6 \pm 49.5 ^{a,b}	326 \pm 130.6 ^b
HDL (mg/dL)	24.0 \pm 0.8 ^a	27.7 \pm 7.5 ^a	17.9 \pm 5.9 ^a
LDL (mg/dL)	15.4 \pm 0.3 ^a	42.2 \pm 9.1 ^a	62.5 \pm 44.6 ^a
VLDL (mg/dL)	26.9 \pm 6.5 ^a	45.9 \pm 9.9 ^{a,b}	51.3 \pm 18.9 ^b

Tabla 1. Concentración de glucosa, insulina, HOMA-IR y perfil de lípidos en ratos macho Wistar tratadas con dieta obesogénica y estreptozotocina, en comparación con dieta estándar

se observó menor acumulación de triacilglicéridos en los animales con DO vs. DE, lo que sugiere acumulación de lípidos en hígado, páncreas y músculo, mientras que en DO+STZ se observó menor concentración de glucosa.

Discusión y conclusiones

La intervención de una dieta obesogénica con 20% fructosa, 20% manteca de origen animal (grasa saturada) y 0.15% de colato (sal biliar), en conjunto con una única dosis de 40 mg/kg de peso de estreptozotocina, mostró en la segunda semana de intervención una modificación en la ganancia de peso; sin embargo, al final del tratamiento no hubo cambio significativo con respecto de este rubro (figura 1). Lo anterior posiblemente fue debido a los mecanismos de adaptación propios de las ratas, las cuales pueden mantener su peso en periodos cortos y solo ver modificaciones a largo plazo (3 meses en adelante) (Feijó et al., 2013); sin embargo, pueden modificar su composición corporal y los parámetros metabólicos (Mamikutty et al., 2014; Takasu et al., 2017), que fue lo que se observó en este trabajo.

Nuestro modelo conservó concentraciones de insulina similares entre los grupos, lo que sugiere que la STZ no

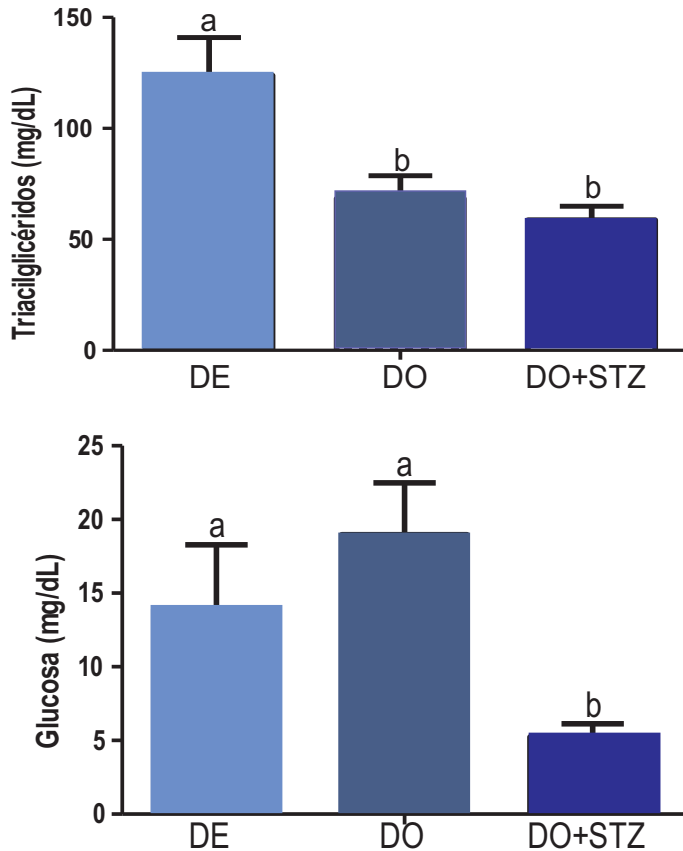


Figura 2. Parámetros metabólicos en tejido adiposo visceral. Se analizó el lisado del tejido adiposo visceral para la determinación de parámetros bioquímicos por métodos enzimáticos-colorimétricos. DE: dieta estándar; DO: dieta obesogénica; DO+STZ: dieta obesogénica + estreptozotocina. Se presentan los datos como media \pm desviación estándar, se compararon medias con ANOVA *post hoc* Tukey, letras diferentes $p \leq 0.05$.

provocó destrucción total de las células β pancreáticas (datos no publicados), pero sí cambios suficientes para lograr modificaciones en las concentraciones séricas de glucosa, que fue 2.6 veces mayor (tabla 1, $p \leq 0.05$) en la DO+STZ que en DE. De igual forma, el HOMA-IR en DO+STZ se modificó significativamente (2.2 veces mayor), modelo matemático cuyo valor es proporcional a la resistencia a la insulina, lo que sugiere RI y disminución de internalización de glucosa, indicativos de DM2. En un estudio similar, en donde se administraron 65 mg/kg de peso de STZ, se alcanzaron valores arriba de 700 mg/dL de glucosa, en cuyo caso administraban insulina NPH (protamina neutra de Hagedorn) para regular los valores, con lo que se logró una media de glucosa de 508.5 ± 23.5 mg/dL después de 8 semanas de tratamiento; sin embargo, ya que para el grupo de trabajo es importante entender la fisiopatología involucrada en la RI, no

utilizamos ningún fármaco para regular valores extremos de insulina y observar el mecanismo “normal” a corto plazo.

En cuanto al perfil de lípidos (tabla 1), se observa una dislipidemia clásica de diabetes mellitus tipo 2 en el grupo de DO+STZ (Chehade, Gladysz y Mooradian, 2013), con colesterol total 2.2 veces mayor, triacilglicéridos 2.4 veces mayores, HDL (lipoproteína de alta densidad) 0.3 veces menor, LDL (lipoproteína de baja densidad) 4.1 veces mayor y VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) 1.9 veces mayor en comparación con la DE. Otros estudios con dieta con 60% de lípidos (mantequilla) y colato durante seis semanas muestran dislipidemia más notoria, que alcanza concentraciones de triacilglicéridos mayores a 600 mg/dL y alteraciones hepáticas, pero con una glucosa menor a 200 mg/dL (Jamshed et al., 2014); mientras tanto, en un estudio en donde se administró una dieta con fructosa al 50% y aceite de coco durante 20 semanas, en un periodo más prolongado, se observaron valores similares a los reportados por nuestro estudio (Lin et al., 2017). Lo anterior nos sugiere que, con el procedimiento utilizado, podemos generar un modelo de obesidad y DM2 en 6 semanas.

Como parte del desarrollo de RI, la acumulación de lípidos (triacilglicéridos) disminuye en el tejido adiposo, debido a su disfunción e inflamación; entonces, la acumulación de lípidos tiene lugar en hígado, músculo y células β pancreáticas (Skovso, 2014) tal y como se observa en la figura 2, donde la DO+STZ mostró menor concentración de glucosa en el lisado de tejido adiposo visceral, en comparación con la DE, lo que podría indicar RI, además de coexistir con menor acumulación de lípidos en el tejido adiposo.

Nuestro modelo es adecuado para el estudio integral de diabetes mellitus tipo 2 y obesidad; con la dieta obesogénica, se puede observar el inicio de la resistencia a la insulina con concentraciones de glucosa sérica similares a la dieta estándar, pero con un índice HOMA-IR 37% mayor; es decir, requerían mayor cantidad de insulina para mantener la glucemia. En el caso de la dieta obesogénica con STZ, el índice HOMA-IR subió 118% con concentraciones de glucosa sérica mayores que en la DE, acompañado de una dislipidemia clásica de diabetes (concentraciones elevadas de colesterol y triacilglicéridos vs. concentraciones bajas de HDL). Además, la baja

concentración de triacilglicéridos en el lisado tisular, proveniente de tejido adiposo visceral, sugiere el inicio de un proceso de lipotoxicidad (datos no publicados) y de RI, ya que, como la insulina no es capaz de realizar sus funciones, la glucosa al interior de la célula es menor; esto se ve acompañado de una pérdida de la funcionalidad del tejido adiposo para almacenar triacilglicéridos, por lo que la acumulación de lípidos comienza a darse en otros tejidos, como hígado, páncreas y músculo (datos no publicados). Las concentraciones de insulina no mostraron disminución significativa entre los grupos; sin embargo, el nivel más bajo en el DO+STZ podría sugerir una menor cantidad de células β debido al fármaco, lo que posiblemente esté relacionado con la concentración elevada de glucosa sérica determinada.

Este modelo para diabetes tipo 2, comparado con el uso de animales transgénicos, es de menor costo, no requiere instalaciones ni personal tan especializado y la fisiopatología no está estrechamente relacionada a un factor genético; los modelos animales con modificaciones en la dieta se asemejan a lo que sucede en el humano (sobrealimentación con grasa saturada animal y carbohidratos simples) y la adición de estreptozotocina en una sola dosis reduce a un tercio el tiempo para desarrollar el modelo, en comparación con otros propuestos (Furman, 2015). Nuestro modelo permitirá un mejor entendimiento de la fisiopatología, incluido el papel que tienen los segundos mensajeros en la captación de glucosa, el desarrollo de estrategias para la prevención, diagnóstico y tratamientos oportunos, tanto dietéticos como farmacológicos y relativos a modificaciones en el estilo de vida. Hacen falta más estudios sobre las complicaciones asociadas a diabetes mellitus tipo 2 a largo plazo.

Referencias bibliográficas

- Blüher M (2016). Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clinical Science*, 130(18), 1603–1614. Disponible en: <https://doi.org/10.1042/CS20160005>
- Chehade JM, Gladysz M y Mooradian AD (2013). Dyslipidemia in type 2 diabetes: prevalence, pathophysiology, and management. *Drugs*, 73(4), 327–339. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0023-5>
- Feijó F de M, Ballard CR, Foletto KC, Batista BAM, Neves AM, Ribeiro MFM y Bertoluci MC (2013). Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*, 60, 203–207. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.APPET.2012.10.009>
- Furman BL (2015). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. In *Current Protocols in Pharmacology* (vol. 70, p. 5.47.1-5.47.20). EUA: John Wiley & Sons, Inc. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
- Gómez-Hernández A, Beneit N, Díaz-Castroverde S y Escribano Ó. (2016). Differential role of adipose tissues in obesity and related metabolic and vascular complications. *International Journal of Endocrinology*, 2016, 1-14. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2016/1216783>
- Higashiyama H, Uemura M, Igarashi H, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M y Kanai Y (2018). Anatomy and development of the extrahepatic biliary system in mouse and rat: a perspective on the evolutionary loss of the gallbladder. *Journal of Anatomy*, 232(1), 134-145. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/joa.12707>
- INEGI (2016). Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Recuperado el 28 de marzo de 2018 de: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- Jamshed H, Arslan J y Gilani AUH (2014). Cholesterol-cholate-butterfat diet offers multi-organ dysfunction in rats. *Lipids in Health and Disease*, 13, 194-204. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-194>
- Kerner W Brückel J y Kerner W (2014). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 122, 384-

Agradecimientos

Agradecemos a: Dra. Dalia Luna, Dra. Teresa García Gasca, Dra. Sabina Wischin, LN Ana Vega, Dra. Aracely Anaya, MNH Josué López, Xianny Pichardo, Celeste Sosa, Jaqueline González, Lilia Ruiz, MVZ Verónica Andrade, FCN-UAQ; MVZ Martín Servín, Dra. Alejandra Castilla, Dra. Olivia Vázquez, Unidad de Proteogenómica: Dra. Anaid Antaramian, M. en C. Adriana González, INB-UNAM; QFBT Eduardo Márquez, INER.

Financiamiento

El proyecto fue financiado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (Df1600004770). Adriana Becerril recibió la beca CONACYT 775215.

386. Disponible en: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1366278>

Lin CI, Shen CF, Hsu TH y Lin SH (2017). A high-fructose-high-coconut oil diet induces dysregulating expressions of hippocampal leptin and stearoyl-CoA desaturase, and spatial memory deficits in rats. *Nutrients*, 9(6), 619. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/nu9060619>

Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Mohd Yusof MR y Haji Suhaimi F (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed Research International*, 2014, 263897. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2014/263897>

Olivares AM, Althoff K, Chen GF, Wu S, Morrisson MA, DeAngelis MM y Haider N (2017). Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Current Diabetes Reports*, 17(10), 93. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0913-0>.

Robinson KA, Hegyi K, Hannun YA, Buse MG y Sethi JK (2014). Go-6976 reverses hyperglycemia-induced insulin resistance independently of cPKC inhibition in adipocytes. *PLoS ONE*, 9(10), 1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108963>

Skovsø S (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Invest*, 5, 349-358. disponible en: <https://doi.org/10.1111/jdi.12235>

Takasu T, Hayashizaki Y, Hirosumi J, Minoura H, Amino N, Kurosaki E y Takakura S (2017). The sodium glucose cotransporter 2 inhibitor ipragliflozin promotes preferential loss of fat mass in non-obese diabetic goto-kakizaki rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 40(5), 675-680. Disponible en: <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00964>