

## Revisión

# Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2

J. Arias-Díaz y J. Balibrea

*Departamento de Cirugía. Hospital Clínico San Carlos. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. España.*

### Resumen

Aún persisten múltiples incógnitas acerca de los mecanismos patogénicos de una enfermedad tan prevalente hoy día como es la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). El avance en la prevención y tratamiento de la misma dependerá en gran parte de la comprensión de estos mecanismos y para ello es imprescindible seguir utilizando modelos animales en los que realizar experimentos que serían éticamente inaceptables en humanos.

La DM2 representa un heterogéneo grupo de enfermedades caracterizado por un aumento en la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos y un deterioro en la secreción de dicha hormona por parte de la célula  $\beta$  pancreática, encontrándose ambas anomalías íntimamente imbricadas. La citada heterogeneidad de la DM2 se ve así mismo reflejada en la gran diversidad de modelos animales útiles para su estudio.

Se revisan los principales modelos de DM2, clasificándolos, según su mecanismo de producción, en espontáneos e inducidos. También se distinguen dos categorías en cada uno de ellos: modelos análogos, que intentan imitar a la enfermedad humana, y modelos intrínsecos, con los que se pretende contestar preguntas concretas de aspectos específicos de la misma.

La decisión acerca del modelo a usar para un experimento en particular es a menudo multifactorial. De modo ideal, los experimentos deberían ser llevados a cabo en varios modelos diferentes, teniendo en cuenta que ninguno de ellos refleja por completo la complejidad de la DM2 humana y que se deben extremar las precauciones a la hora de hacer cualquier tipo de extrapolación a la clínica.

(*Nutr Hosp.* 2007;22:160-68)

Palabras clave: *Diabetes mellitus tipo 2. Modelos experimentales diabetes. Ratas BB. Síndrome metabólico. Resistencia insulínica.*

**Correspondencia:** Javier Arias-Díaz  
Departamento de Cirugía. Hospital Clínico San Carlos  
Facultad de Medicina. Universidad Complutense  
Ciudad Universitaria  
28040 Madrid  
E-mail: javardi@gmail.com

Recibido: 2-XI-2006.  
Aceptado: 9-XI-2006.

### ANIMAL MODELS IN GLUCOSE INTOLERANCE AND TYPE-2 DIABETES

#### Abstract

There still are many unknown facts about the pathogenic mechanisms of such a prevalent disease nowadays as type-2 diabetes mellitus (DM2). The advances in diabetes prevention and management will greatly depend on the understanding of these mechanisms; therefore, it will be essential to keep on using animal models on which carrying out experiments that would be unethical in humans.

DM2 represents a heterogeneous group of diseases characterized by an increase in insulin resistance at peripheral tissues and a deterioration in insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells, both abnormalities being highly interweaved. The mentioned heterogeneity of DM2 is also reflected by the high diversity of useful animal models for its study.

The main DM2 models are reviewed, classifying them by their mechanism of action in spontaneous or induced. Also, two categories in each one of them are distinguished: analogous models, which try to imitate the human disease, and intrinsic models, with which we pretend to answer specific questions about the disease.

The decision about which model to use for a particular experiment usually is multifactorial. Ideally, the experiments should be carried out in several different models, taking into account that none of them completely reflects the complexity of human DM2 and that precautions should be taken when trying to extrapolate the findings to the clinical practice.

(*Nutr Hosp.* 2007;22:160-68)

Key words: *Diabetes mellitus type 2. Diabetes mellitus. Experimental. Rats. Inbred BB. Metabolic syndrome X. Insulin resistance.*

## Introducción

La diabetes mellitus comprende un espectro de enfermedades con una característica común: la hiperglicemia. Ésta puede ser debida a un déficit casi absoluto de insulina (diabetes tipo 1, diabetes juvenil o insulina-dependiente) o a un déficit relativo de la misma (diabetes tipo 2). Las manifestaciones clínicas de la diabetes tipo 1 se conocen desde antiguo, aunque sólo en fecha relativamente reciente se ha reconocido su patogenia autoinmune. En el caso de la diabetes tipo 2, las células  $\beta$  pancreáticas no pueden secretar insulina de modo adecuado, generalmente en presencia de un aumento progresivo de la resistencia periférica a dicha hormona. Aún persisten múltiples incógnitas acerca de los acontecimientos que dan lugar a la disfunción de la célula  $\beta$ , tanto a nivel fisiológico como molecular. La comprensión de los mismos es imprescindible para el avance en la prevención y tratamiento de esta enfermedad, que ya afecta a cerca de 150 millones de personas en todo el mundo.

Todavía hay muchos impedimentos para el estudio de la diabetes en seres humanos. Éstos incluyen heterogeneidad genética, una esperanza de vida larga, una amplia diversidad de estilos de vida, relativa inaccesibilidad a tejidos y órganos y, por supuesto, consideraciones de tipo ético. El uso de modelos animales soslaya algunos de estos problemas, pero, obviamente, la extrapolación de resultados de animales al hombre (y viceversa) conlleva cierto riesgo. No obstante, las ventajas inherentes a la experimentación animal han permitido obtener gran cantidad de información valiosa acerca de la patogénesis de la enfermedad. En 1922, Banting, Best, Collip y colaboradores publicaron su histórico artículo describiendo la curación de la diabetes mellitus en un perro<sup>1</sup>. A partir de entonces se utilizaron ampliamente tanto perros como animales de otras especies para analizar diversos parámetros biológicos y fisiológicos de la diabetes.

### Diabetes tipo 1

Tras el descubrimiento de la insulina, la disponibilidad de modelos animales para el estudio de la patogénesis de la diabetes tipo 1 se demoró sin embargo otros 50 años. Uno de los primeros modelos fue la insulinitis experimental inducida mediante administración de preparaciones de insulina en diversas especies animales. Este tipo de modelos reproducían los hallazgos morfológicos de la insulinitis, pero raramente indujeron hiperglicemia. Más adelante, en ratones, llegaron descripciones de la diabetes con un posible componente inmune tras infección con el virus de la encefalomiocarditis, así como tras la administración de dosis bajas múltiples de estreptozotocina, que inducía tanto insulinitis como hiperglicemia<sup>2</sup>.

Aunque la diabetes espontánea no es una enfermedad exclusiva del hombre, las descripciones de la enfermedad en animales son muy escasas. En 1974, se observó que una rata en los laboratorios de BioBreed-

ing en Canadá desarrolló espontáneamente diabetes con insulinitis y cetoacidosis. Algunos años más tarde, un ratón que también desarrolló diabetes e insulinitis espontáneas fue descubierto en el Japón. Ambos modelos, la rata de BioBreeding (BB) y el ratón diabético no-obeso (NOD), se han convertido en los modelos experimentales más importantes de diabetes tipo 1<sup>3</sup>. La investigación se encuentra más avanzada en el caso del ratón NOD, ya que las tecnologías genéticas tipo knock-out y transgénicos tienen mayor difusión en ratones, así como una mayor variedad de anticuerpos específicos se hallan disponibles comercialmente para esta especie. Además, la rata BB se caracteriza por un tipo de inmunodeficiencia grave, por lo que tiene poco en común con la mayoría de los humanos que sufren diabetes. Durante las últimas dos décadas, han aparecido miles de artículos que, utilizando estos modelos y otros similares, sugieren nuevas hipótesis inmunológicas y novedosas estrategias de intervención terapéutica para la diabetes tipo I.

### Diabetes tipo 2

En 1866, G. Harley, un médico inglés, notó que existían, al menos, dos formas diferentes de diabetes mellitus; y, en 1880, E. Lancereaux, hizo la distinción entre las formas de diabetes mellitus del obeso (*diabete gras*) y del delgado (*diabete maigre*)<sup>4</sup>. Aunque la insulina se descubriera en la década de los 20, la comunidad médica seguía perpleja ante las diferentes manifestaciones clínicas de las dos formas de diabetes mellitus. En 1931, W. Falta y R. Boller, describieron la diferencia entre las formas insulina-sensible e insulina-resistente de la enfermedad<sup>5</sup>, pero la primera evidencia directa de que la forma de inicio precoz (juvenil) se diferenciaba de la del adulto por la ausencia de insulina circulante llegó en 1951, con el desarrollo de un bioensayo para detectar insulina en sangre<sup>6</sup>. Poco después se documentó que los extractos de páncreas procedentes de diabéticos juveniles tenían niveles de insulina casi indetectables<sup>7</sup>. Draper y cols., entretanto, habían clasificado la diabetes mellitus en grupo I y II de acuerdo a parámetros físicos (jóvenes delgados y adultos con exceso de grasa corporal, respectivamente)<sup>8</sup>. Lister y cols. insistieron así mismo en esta distinción, y designaron los dos tipos corporales como tipo I y II<sup>9</sup>, pero dicha terminología no tuvo general aceptación hasta 1976, cuando fue reintroducida por A. G. Cudworth<sup>10</sup>.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) representa un heterogéneo grupo de enfermedades caracterizado por un aumento en la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos y un deterioro en la secreción de dicha hormona por parte de la célula  $\beta$  pancreática<sup>11</sup>. Ambas anomalías se encuentran íntimamente imbricadas, pero, en la mayoría de los enfermos, la resistencia a la insulina precede a la disfunción manifiesta de las células  $\beta$ , y se piensa que tiene su origen en una predisposición genética. Además, puede observarse

disfunción subclínica de las células  $\beta$  en familiares de primer grado no diabéticos de pacientes con DM2, lo cual es consistente con la hipótesis de que el fracaso de la célula  $\beta$  se encuentra también determinado genéticamente<sup>12</sup>. Por otro lado, de modo similar a lo que ocurre en los pacientes con diabetes tipo 1, en la gran mayoría de casos de DM2 el control de la glicemia muestra un deterioro inexorable con el tiempo, conduciendo a complicaciones tales como ceguera, neuropatía, nefropatía y enfermedad cardiovascular.

Hoy en día se reconoce que algunos subtipos de DM2 son secundarios a defectos monogénicos, tales como el síndrome juvenil de diabetes del adulto (*maturity-onset diabetes of the young* —MODY—)<sup>13</sup>, síndromes de resistencia grave a la insulina<sup>14</sup> y la llamada diabetes mitocondrial<sup>15</sup>. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con DM2, varios (si no múltiples) factores genéticos y ambientales contribuyen tanto al origen como a la progresión y complicaciones tardías de la enfermedad.

La identificación de los genes responsables permitiría avanzar en el conocimiento de los mecanismos que mantienen los niveles normales de glucosa y cuya disfunción provoca la enfermedad. Además, podría ayudar a obtener fármacos antidiabéticos más eficaces, diseñados para contrarrestar la anomalía específica, así como a identificar los individuos de riesgo que más podrían beneficiarse de tratamientos y/o cambios en el estilo de vida antes de que la enfermedad se desarrolle.

La predisposición a la resistencia insulínica y/o a la disfunción de células  $\beta$  se hereda de forma no Mendeliana<sup>16</sup>, debido a su heterogeneidad genética y patogénesis multigénica. Además, factores medioambientales tales como dieta inadecuada e inactividad física pueden modular las manifestaciones del genotipo (penetrancia incompleta) o bien imitar la contribución genética, dando lugar a fenocopias<sup>17</sup>. Así pues los estudios genéticos humanos acerca de la predisposición a la resistencia insulínica están plagados de incertidumbres y se ven complicados además por las considerables variaciones existentes en el pool genético humano. Este es el motivo de que se hayan diseñado multitud de modelos animales (en su gran mayoría, ratones) transgénicos y knock-out, portadores de mutaciones en genes requeridos para la secreción y/o acción de la insulina, como método de análisis de un sistema genético de semejante complejidad.

La obesidad y la consiguiente resistencia a la insulina son un prelude habitual de la DM2 humana. Por tanto, no es de extrañar que se hayan usado modelos animales de obesidad para intentar aprender más sobre la enfermedad humana. Algunas cepas mantienen la euglicemia a base de desarrollar una sólida y persistente respuesta compensadora de las células  $\beta$ , imitando la resistencia a la insulina con hiperinsulinemia asociada. El ratón *ob/ob* y las ratas *fa/fa* ejemplifican dicho fenómeno. Otros, tales como el ratón *db/db* y el *Psammomys obesus* (ver más adelante) desarrollan rápidamente hiperglicemia, ya que sus células  $\beta$  son incapaces de mantener durante toda su vida los elevados

niveles de producción insulínica requeridos. La investigación de estos modelos puede ayudar a explicar porqué algunos humanos con obesidad mórbida nunca desarrollan DM2 mientras que otros desarrollan hiperglicemia con grados de resistencia a la insulina y obesidad relativamente modestos.

## Modelos de diabetes tipo 2

La DM2 puede presentarse espontáneamente en los animales, habiendo sido reconocida la enfermedad en diversos mamíferos, incluyendo tanto animales domésticos como ganado y animales mantenidos en cautiverio; puede también ser inducida de forma experimental y, en ocasiones, combinarse ambas causas.

Tal como era de esperar, los modelos animales de DM2 son tan complejos y heterogéneos como lo es el propio síndrome en humanos. En el espectro patogénico de la DM2 se encuentra todo el rango de posibilidades, predominando en algunos animales la resistencia a la insulina mientras que, en extremo opuesto, otros sufren sobre todo disfunción de las células  $\beta$ . También pueden aportar información valiosa para la DM2 humana aquellos modelos donde la intolerancia a la glucosa es parte de un fenotipo más complejo, tal como el que incluye obesidad, dislipemia e hipertensión. No se puede hablar de modelos mejores y peores, pues sólo interpretando los datos procedentes de los diversos modelos es como más probablemente surgirán avances significativos de utilidad para la enfermedad humana.

En una primera clasificación, podemos dividir los modelos de DM2 según su mecanismo de producción en modelos espontáneos e inducidos. Además, en cada uno de ellos se pueden distinguir dos categorías: modelos análogos y modelos intrínsecos (tabla I). Esta

**Tabla I**  
Clasificación de los modelos animales de diabetes mellitus tipo 2

### 1. Modelos espontáneos

#### 1.1. Modelos análogos

- La rata Goto-Kakizaki (GK)
- El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)
- El ratón KK
- *Psammomys obesus* (rata israelí de la arena)
- La rata OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat*)

#### 1.2. Modelos intrínsecos

- El ratón *db/db*
- El ratón *ob/ob*
- El ratón *Agouti*
- La rata Zucker (*fa/fa*)

### 2. Modelos inducidos

- 2.1. Inducción hormonal
- 2.2. Administración de fármacos
- 2.3. Manipulación genética

última distinción es más útil en el caso de modelos espontáneos, por lo que sólo la utilizaremos en éstos. Los modelos análogos son útiles como sustitutos de la enfermedad humana, y permiten hasta cierto punto hacerla accesible a la experimentación. Los modelos intrínsecos, a diferencia de los anteriores no tratan de imitar la enfermedad humana, sino que sirven para contestar preguntas concretas de aspectos específicos de la misma. Por ejemplo, existen una serie de mutaciones aisladas que se asocian con obesidad y aparición de DM2 en ratones. Tal como discutimos previamente, en humanos es raro que la obesidad o la diabetes surjan como consecuencia de una mutación única; por tanto esos ratones ejemplifican modelos intrínsecos, no análogos, de diabetes. Sin embargo, de modo inesperado, los estudios con ratones portadores de mutaciones *ob* y *db* condujeron al descubrimiento de una molécula clave involucrada en la fisiología del apetito y la regulación energética, la leptina. Un modelo de DM2 inicialmente intrínseco, como el ratón *db*, se convirtió en un modelo análogo de anomalía en la regulación del apetito. Por tanto, los modelos intrínsecos y análogos pueden intercambiar sus papeles, una vez que aprendemos a reconocer la realidad que hay tras las apariencias.

### 1. Modelos espontáneos

Se trata de estirpes que se mantienen relativamente inalteradas mediante cruces endogámicos y que proceden bien de un animal en el que se ha detectado diabetes espontánea, bien de una serie de cruces selectivos favoreciendo un determinado rasgo fenotípico de la DM2 humana. A veces no son totalmente "espontáneos" en el sentido que se requieren modificaciones dietéticas adicionales para generar la diabetes en el seno de una predisposición genética, es el ejemplo del *Psammomys obesus* que comentamos más abajo.

#### 1.1. Modelos análogos

Se han sometido a análisis genético un amplio abanico de modelos análogos de DM2 intentando descubrir nuevos genes de susceptibilidad para extrapolar su estudio a humanos. A continuación resumimos los modelos de este tipo más conocidos, destacando por su importancia de dos de ellos: la rata Goto Kakizaki (GK) y el ratón obeso de Nueva Zelanda (*New Zealand Obese*, NZO), una cepa seleccionada por su predisposición a DM2 inducida por obesidad, la cual se asemeja bastante a la DM2 humana.

##### 1.1.1. La rata Goto-Kakizaki (GK)

El mejor modelo espontáneo de DM2 es la rata GK, que fue desarrollado en la década de los 90 por dos investigadores japoneses mediante cruces endogámicos recurrentes de ratas no diabéticas (Wistar), pero con niveles plasmáticos de glucosa en el límite alto de la

normalidad<sup>18</sup>. Dicho modelo reproduce bien las principales características de la DM2 humana: hiperproducción de glucosa, reducción de la tolerancia a la misma, deterioro en la secreción de insulina, aumento de la resistencia periférica a la insulina y alteración en el metabolismo lipídico. Típicamente, la glicemia en ayunas está sólo ligeramente elevada, pero aumenta considerablemente tras la ingesta de glucosa. Al nacer, la rata GK presenta un número reducido de islotes de Langerhans<sup>19</sup>.

Este modelo sugiere la participación de 6 regiones cromosómicas en la etiología de la enfermedad<sup>20-22</sup>, aunque los genes responsables aún parecen encontrarse lejos de ser identificados. Aparte del determinismo genético, dicho modelo sugiere así mismo la existencia de factores epigenéticos, de tal manera que la hiperglicemia *in utero*, cuando la hembra GK expone a su feto a niveles altos de glucosa, puede ser responsable del desarrollo anormal de las primeras células  $\beta$  en el esbozo pancreático<sup>23</sup>, de ahí la idea de que la DM2 humana pueda tener su origen en el desarrollo fetal temprano y permanecer posteriormente latente durante décadas.

Al igual que otros modelos animales de diabetes, la rata GK desarrolla algunas características que pueden ser comparadas con las complicaciones de la diabetes humana, incluyendo lesiones renales<sup>24</sup>, cambios estructurales en los nervios periféricos<sup>25</sup> y anomalías en la retina<sup>26</sup>. La investigación de estos fenómenos representa otro ejemplo de cómo el uso de modelos animales abre áreas que no podrían ser fácilmente estudiadas en el humano. Por ejemplo, sería éticamente inaceptable llevar a cabo biopsias seriadas de tejido nervioso o renal, y asimismo sería difícil medir las concentraciones intraoculares de factores de crecimiento sin recurrir a dichos modelos. Sin embargo, es cierto que existen diferencias entre las complicaciones observadas en animales y en humanos, y está en discusión si actualmente se dispone de algún modelo animal que refleje de modo fiable las complicaciones de la diabetes humana.

##### 1.1.2. El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)

Se trata de una cepa endogámica de ratones originaria de Nueva Zelanda y seleccionada por obesidad poligénica<sup>27</sup>. Los ratones NZO de ambos sexos presentan elevado peso desde su nacimiento y aumento de su grasa corporal, que refleja predominantemente hipertrofia de los adipocitos más que hiperplasia de los mismos.

El desarrollo de diabetes en este modelo representa un complejo fenómeno tipo umbral en el que la tasa de adiposidad precoz establece un nivel diabetogénico de resistencia a la insulina<sup>28</sup>. Los ratones NZO machos desarrollan hipertensión cuando se les somete a una dieta con elevado contenido graso. A las 8 semanas de vida, a pesar de la obesidad, los ratones permanecen normoglicémicos y con niveles plasmáticos de insuli-

na y leptina no demasiado elevados. La hiperglicemia es de aparición tardía (alrededor de la semana 16) y evolución crónica una vez establecida. Como anomalías metabólicas precoces se han documentado tanto resistencia a la insulina como excesiva producción de glucosa por parte del hígado<sup>29</sup>.

#### 1.1.3. El ratón KK

El ratón de la cepa KK es uno de los modelos poligénicos más adecuados como análogos de la DM2 con obesidad moderada. La cepa original se obtuvo en Japón, mediante cruces seleccionando los individuos con mayor peso<sup>30</sup> y, de modo característico, estos ratones adquieren obesidad gradual cuando se hacen adultos, además de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia compensadora e hiperplasia de células insulares, apareciendo finalmente una discreta hiperglicemia<sup>31</sup>.

La ingesta alimenticia es un factor de importancia para la gravedad del fenotipo diabético y la restricción de la ingesta calórica reduce tanto la obesidad como la hiperglicemia en estos ratones. En diversas partes del mundo se han criado distintas líneas de ratón KK que, debido a la deriva genética y cruces endogámicos, actualmente difieren tanto genotípica —como fenotípicamente entre sí. Por ejemplo, en una cepa de ratón KK el *Azgp1*, un gen que codifica para una glicoproteína, ha sido propuesto como parcialmente responsable de la predisposición a obesidad y diabetes<sup>32</sup>, pero no está claro que ello sea cierto para otras cepas. Aunque todos los ratones KK proceden en última instancia de la colonia original descrita en 1967<sup>30</sup>, existen actualmente diferencias en las cepas mantenidas en diferentes laboratorios, debido a la dificultad en asegurar un 100% de homogeneidad genética dentro de las cepas endogámicas, incluso tras numerosas generaciones de cruces selectivos. Además, pueden surgir nuevas mutaciones espontáneas algunas de las cuales pueden quedar “fijadas” en una determinada cepa y no en otras. Esta puede ser la explicación de la falta de concordancia entre estudios diseñados para buscar los loci genéticos que confieren susceptibilidad a la DM2 en este modelo<sup>33</sup>. Tales diferencias deben ser siempre tenidas en cuenta cuando se comparan resultados de experimentos similares realizados en distintos laboratorios aunque aparentemente usen el mismo modelo animal de diabetes.

#### 1.1.4. *Psammomys obesus* (rata israelí de la arena)

En su hábitat natural, el *Psammomys obesus* sigue una dieta esencialmente vegetariana, sin embargo, cuando se alimenta con dieta estándar de rata de laboratorio, se hace obeso, resistente a la insulina e hiperglicémico<sup>34</sup>. Si además se usa una dieta rica en colesterol, los animales desarrollan hiperlipidemia y aterosclerosis<sup>35</sup>. Al igual que en la DM2 humana, el estado hiperglicémico se asocia con un aumento de los niveles de proinsulina y productos de fragmenta-

ción, presumiblemente debido a la elevada demanda de secreción insulínica por la resistencia periférica a dicha hormona. También se ha encontrado alteración en la biosíntesis de insulina en los islotes de Langerhans<sup>36</sup>.

Al igual que ocurre con el ratón KK, este modelo es particularmente útil para estudiar los efectos de la dieta y el ejercicio<sup>37</sup> sobre el desarrollo de la DM2.

#### 1.1.5. La rata OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat*)

En 1984, dentro de una colonia de ratas Long-Evans (Charles River, Canada), se descubrió una rata con diabetes espontánea, poliuria, polidipsia y discreta obesidad. Desde entonces, se mantiene una línea de ratas procedentes de aquella en la compañía farmacéutica Otsuka y se las denomina por ello OLETF<sup>38</sup>. Sus características incluyen: a) un desarrollo tardío de la hiperglicemia (tras 18 semanas de edad); b) un curso crónico de la enfermedad; c) discreta obesidad; d) aparición clínica de diabetes principalmente en los machos; e) participación de múltiples genes diabéticos recesivos, la transmisión de uno de los cuales (denominado *odb-1*) se encuentra ligada al cromosoma X, y f) nefropatía diabética, en forma de glomeruloesclerosis difusa y lesiones nodulares. Además, existen alteraciones en los islotes pancreáticos que pueden ser clasificadas en tres estadios: a) precoz (menos de 9 semanas de edad), con discreta infiltración linfocitaria; b) hiperplásico (10-40 semanas de edad), con incremento del número de células y fibrosis dentro o alrededor de los islotes, y c) final (más de 40 semanas de edad), con atrofia de los islotes. Las citadas manifestaciones clínicopatológicas de las ratas OLETF se asemejan bastante a las de la DM2 humana.

Es de destacar que las ratas OLETF son portadoras de un alelo nulo para el gen de la colecistoquinina A (CCK-A), lo cual conlleva una capacidad reducida para procesar las señales gastrointestinales de saciedad tras la ingesta de nutrientes. Esto puede ser la causa de un aumento de la cantidad de alimento en cada ingesta, con hiperfagia y obesidad<sup>39</sup>. Además, los análisis de patrones de expresión génica hipotalámica indican la presencia de un déficit primario en la señalización del neuropéptido Y en el hipotálamo dorsomedial. Así pues, la obesidad en la rata OLETF puede ser debida al mal funcionamiento de dos vías de regulación, una periférica, como es la saciedad tras la ingesta, y otra relacionada con mecanismos centrales críticos para el mantenimiento del balance energético global<sup>40</sup>.

La DM2 de las ratas OLETF puede ser prevenida eficazmente mediante el ejercicio cuyo efecto protector perdura al menos 3 meses tras el cese del mismo<sup>41</sup>. También la administración de insulina logra evitar tanto la disfunción de las células  $\beta$  como los cambios morfológicos en el páncreas<sup>42</sup>.

## 1.2. Modelos intrínsecos

Existen multitud de modelos portadores de mutaciones localizadas que resultan en rasgos fenotípicos imitando alguna de las manifestaciones clínicas de la DM2. En la mayoría de los casos se trata de modelos murinos, por ser los ratones de nuevo más adecuados que las ratas para las técnicas de manipulación y análisis genéticos. Como comentamos previamente, estos modelos son valiosos sobre todo para el estudio de la fisiología y de los mecanismos patogénicos que intervienen en la DM2 y sus complicaciones tardías. Vamos a comentar aquí brevemente sólo los modelos de este tipo más conocidos.

### 1.2.1. El ratón *db/db*

El “gen de la diabetes” (*db*) se transmite de modo autosómico recesivo y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria<sup>43</sup>. La mutación *db/db* muestra muchas de las características de la DM2 humana<sup>44</sup>. La evolución de estos ratones es bifásica, mostrando primero hiperinsulinemia y después hipoinsulinemia. La fase hiperinsulinémica aparece alrededor de los 10 días, acusando ya discreta elevación de la glucemia alrededor del mes y siendo franca la hiperglicemia a las 8 semanas de edad. A los 5 ó 6 meses, el peso corporal comienza a descender en paralelo con una degeneración de las células  $\beta$  de los islotes<sup>45</sup>, entrando en la fase hipoinsulinémica.

### 1.2.2. El ratón *ob/ob*

A diferencia de los mutantes *db/db*, los ratones *ob/ob* son portadores de una mutación en el gen de la propia leptina<sup>46</sup>. Representa un buen modelo para el estudio de la obesidad, siendo la incidencia de diabetes en estos ratones relativamente baja. Esta cepa tiene además una esperanza de vida más larga y sintomatología menos acentuada que la del mutante *db/db*.

### 1.2.3. El ratón *Agouti*

El producto del gen *agouti* codifica una proteína de 131 aminoácidos que contiene una secuencia señalizadora. Dicha proteína es producida en el folículo piloso donde actúa paracrinamente como un antagonista del receptor de la hormona estimulante de melanocitos (MSH). Aquí inhibe la producción de eumelanina inducida por la MSH, causando un color amarillento de su pelaje<sup>47</sup>. Además, una proteína relacionada con el *agouti* también es un potente antagonista selectivo de los subtipos 3 y 4 del receptor de la melanocortina (Mc3r y Mc4r), los cuales son expresados en el hipotálamo y están implicados en la regulación del peso corporal. Los ratones homocigotos para diferentes mutaciones, ya sean Ay (letal) o Avy (viable), en el gen *agouti* muestran un fenotipo complejo con obesidad y resistencia a la insulina, además de su típico color amarillo<sup>47</sup>.

En humanos, *agouti* se expresa en varios tejidos, incluyendo el adiposo<sup>48</sup>, sugiriendo que podría estar implicado en la regulación de la homeostasis energética. En un estudio reciente, ratones transgénicos sobreexpresando *agouti* en tejido adiposo mostraron sobrepeso sin alteración de su ingesta, indicando que el aumento de su grasa corporal puede ser secundario a alteración de su metabolismo energético<sup>49</sup>. Este hallazgo tiene especial relevancia porque sugiere que la expresión de *agouti* en el tejido adiposo humano tiene importancia fisiológica.

### 1.2.4. La rata Zucker (*fa/fa*)

También llamada ZDF (*Zucker Diabetic Fatty Rat*) aludiendo a su característico fenotipo obeso. La mutación “fatty” (*fa*) fue publicada por Zucker and Zucker en 1961<sup>50</sup>. Los animales homocigotos para el alelo *fa* (receptor de la leptina no funcionante) son apreciablemente obesos ya a las 3 a 5 semanas de vida. Para la semana 14, su composición corporal consta de más de un 40% de lípidos. La obesidad se hereda de modo recesivo y los animales afectados son hiperlipidémicos, hipercolesterolémicos e hiperinsulinémicos, y desarrollan hipertrofia e hiperplasia adipocitaria, semejando la obesidad humana, por ello la rata Zucker es el mejor conocido y más ampliamente usado modelo genético de obesidad humana de comienzo precoz. La rata ZDF presenta tanto resistencia a la insulina (como resultado del receptor mutado de leptina, que causa obesidad), como inadecuada compensación por parte de la célula  $\beta$ . Esto último parece depender de un defecto transcripcional en la célula  $\beta$ , que se hereda independientemente de la mutación del receptor de la leptina y la resistencia a la insulina<sup>51</sup>. Las ratas con genotipos homocigoto dominante (+/+) y heterocigoto (*fa*+) no presentan obesidad ni hiperglicemia.

La rata Zucker no ha sido utilizada tan extensamente como modelo de DM2, probablemente porque, a diferencia de los ratones *db/db* y *ob/ob*, su hiperglicemia es discreta<sup>52</sup>, existiendo variaciones entre colonias. Sin embargo, presenta algunas complicaciones similares a la DM2 humana<sup>53</sup>, así como hiperinsulinemia secundaria a resistencia periférica a la insulina, la cual es especialmente marcada en el músculo e hígado<sup>54</sup>.

## 2. Modelos inducidos

Se pueden reproducir en animales una o más de las manifestaciones clínicas de la DM2 humana mediante diversos métodos, siendo los más utilizados actualmente los métodos genéticos que generan modelos intrínsecos con mutaciones específicas.

### 2.1. Inducción hormonal

La administración de corticoides en diversos períodos de la vida del animal puede causar un estado simi-

lar a la DM2 humana<sup>55</sup>, este modelo sería especialmente apropiado para el estudio de la DM2 que aparece en humanos trasplantados o en tratamiento esteroideo crónico por otro motivo, pudiendo considerarse por tanto un modelo de los que hemos clasificado como “análogos”. Otras hormonas que pueden causar hiperglicemia en animales son la somatostatina, el glucagon, las catecolaminas y la tiroxina.

## 2.2. Administración de fármacos

Otros modelos están basados en la administración de determinadas sustancias con efectos tóxicos sobre las células  $\beta$ . Por ejemplo, la estreptozotocina (STZ), un antibiótico utilizado en la quimioterapia del cáncer, induce DM2 en roedores recién nacidos no predispuestos, mediante la destrucción de sus células  $\beta$ . Otro fármaco utilizado a veces con el mismo fin es el aloxano<sup>56</sup>.

La STZ es un derivado de la nitrosourea aislado del *Streptomyces achromogenes* con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro<sup>57</sup>. Se trata de un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa<sup>58</sup> y la función de la glucocinasa<sup>59</sup>, e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del DNA<sup>60</sup>. En este sentido, la STZ actúa como un caballo de Troya, ya que su molécula consta esencialmente de glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea, y como tal es internalizada a través de los transportadores celulares de glucosa. Una vez dentro, el fragmento de nitrosourea es liberado y ejerce su actividad tóxica. Dado que las células  $\beta$  pancreáticas son más activas que las demás en la captación de glucosa (tienen que monitorizar continuamente sus niveles plasmáticos), también resultan más sensibles al efecto tóxico de la STZ.

La sensibilidad a la STZ varía según la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional. El modo y ruta de su administración resultan determinantes para su efecto. Una única dosis importante de estreptozotocina puede inducir diabetes en roedores, probablemente debido a efecto tóxico directo. De modo alternativo, se puede usar en forma de múltiples dosis pequeñas (p. ej., 40 mg/kg en 5 días consecutivos). Administrada de este modo, induce una diabetes insulínopénica en la que interviene el sistema inmune, tal como ocurre en la diabetes DM1 humana. El modelo de baja dosis múltiple de estreptozotocina ha sido ampliamente utilizado para estudiar los acontecimientos inmunológicos que conducen a la insulinitis y muerte celular  $\beta$ <sup>61-64</sup>, sin embargo, sigue produciendo diabetes incluso en ausencia de células T y B funcionantes<sup>65</sup>, lo que sugiere que, aún a estas dosis, permanece cierto grado de toxicidad sobre las células  $\beta$ , predispóniéndolas al fracaso en presencia de algún tipo de sobrecarga o simplemente con el tiempo. De este modo, se ha utilizado el modelo de administración neonatal de STZ como modo de producir un modelo de DM2 en los roedores ya adultos<sup>66,67</sup>.

La principal ventaja de los modelos basados en administración de fármacos es que el grado de alteración de las células  $\beta$  puede ser regulado de acuerdo con la dosis de toxina administrada. Su gran desventaja reside en que rara vez la diabetes humana es causada por un tóxico de este tipo.

## 2.3. Manipulación genética

La introducción de las técnicas de biología molecular dio lugar a la aparición de un gran número de modelos animales útiles para el estudio de la DM2. Al modificar genes específicos, dichas técnicas permiten, al menos teóricamente, generar modelos casi “a la carta”, por ejemplo se pueden producir ratones que sobreexpresen o carezcan de una proteína determinada, que sospechamos juegue algún papel en el metabolismo de la glucosa. Este tipo de modelos se ha desarrollado especialmente en ratones debido a que hay más herramientas moleculares y tecnologías disponibles para esta especie<sup>68</sup>.

Los tipos de manipulaciones que afectan a un gen específico y que pueden interesar para producir un modelo son:

- a) Sobreexpresión, da lugar a ratones llamados transgénicos.
- b) Eliminación: da lugar a ratones llamados “knock-out”.
- c) Reemplazo (con una forma alterada): da lugar a ratones llamados “knock-in”.

Los animales transgénicos se obtienen mediante la incorporación de un gen modificado (transgen) en el pronúcleo de un oocito fertilizado, siendo implantado posteriormente éste en una madre adoptiva. El transgen se incorpora de modo aleatorio en el genoma y sólo una pequeña proporción de oocitos fertilizados dará lugar a una primera generación que expresa el gen de interés.

Para obtener animales “knock-out” y “knock-in” se elimina, altera o sustituye el gen correspondiente en células troncales embrionarias, las cuales se inyectan en un embrión precoz, en el cual se integran, dando lugar a animales quiméricos. En los animales en los que las células descendientes de las inyectadas dan lugar a línea germinal, el gen de interés estará en sus gametos y pasará a la descendencia. Con cruces selectivos obtendremos animales con una o con ambas copias del gen alteradas.

En el ratón hay 22.000 a 25.000 genes, de los cuales varios cientos han sido ya selectivamente modificados con el fin de investigar su función. No todas las modificaciones resultan en descendencia viable, lo cual se ha intentado obviar con un refinamiento técnico ulterior, dando lugar a los llamados “knock-out” o “knock-in” condicionales. En esencia, esta variante consiste en hacer que se exprese el gen modificado sólo en determinados tejidos o bien en determinado mo-

mento del desarrollo elegido por el investigador, con lo cual se logra que el ratón se desarrolle y sea viable para poder ser estudiado.

Los modelos generados mediante este tipo de heramientas moleculares no se encuentran sin embargo exentos de limitaciones. Por el simple hecho de aumentar o disminuir la expresión de un gen estamos induciendo la alteración de otros muchos por un mecanismo compensador. Por ejemplo, eliminando por completo el gen del sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS1) serían de esperar consecuencias fisiológicas más importantes que las que se obtienen, dado el papel central que posee dicha proteína en la señalización intracelular<sup>69</sup>, en este caso la redundancia en la cascada de señalización de la insulina es capaz de anular prácticamente por completo los efectos de la manipulación genética. Por el contrario, los “knock-out” homocigotos para el gen del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2) desarrollan diabetes alrededor del día 10 de vida, junto con resistencia hepática a la insulina y reducción en la masa de células  $\beta$  pancreáticas<sup>70</sup>.

## Conclusión

Existen multitud de modelos experimentales potencialmente útiles para el estudio de los diversos aspectos de la DM2 humana. La decisión acerca del modelo a usar para un experimento en particular es a menudo multifactorial. De modo ideal, los experimentos deberían ser llevados a cabo en varios modelos diferentes, aunque en la práctica los grupos de investigación tienden a acumular experiencia con una cepa determinada. En cualquier caso, es necesario comprender que, en general, un modelo animal a lo más que puede aspirar es a representar un aspecto o subtipo de DM2 humana, y que, por tanto, hay que extremar las precauciones a la hora de hacer cualquier tipo de extrapolación a la clínica.

## Referencias

1. Banting FG, Best DH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary report. *CMAJ* 1922; 22: 141-146.
2. Rossini AA, Mordes JP. Insulin dependent diabetes mellitus, experimental models. En: Roitt IM, editor. *Encyclopedia of Immunology*. San Diego: Academic Press, 1992: 872-877.
3. Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *Ilar Journal* 2004; 45 (3): 278-291.
4. Gale EA. The discovery of type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; 50(2):217-26.
5. Falta W, Boller R. Insularer und insulinresistenter diabetes. *Klin Wochenschr* 1931; 10: 438-443.
6. Bornstein J, Lawrence RD. Two types of diabetes mellitus, with and without available plasma insulin. *BMJ* 1951; 1:732.
7. Wrenshall GA. Extractable insulin of pancreas. *Diabetes* 1952; 1: 87-107.
8. Draper G, Dupurtuis CW, Caughey JL. *Human Constitution in Clinical Medicine*. New York: Harper, 1944.
9. Lister J, Nash J, Ledingham U. Constitution and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *BMJ* 1951; 1: 376-379.
10. Cudworth AG. The aetiology of diabetes mellitus. *Br J Hosp Med* 1976; 16: 207-216.
11. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414 (6865): 799-806.
12. Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus —a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 1996; 334 (12): 777-83.
13. Stride A, Hattersley AT. Different genes, different diabetes: lessons from maturity-onset diabetes of the young. *Ann Med* 2002; 34 (3): 207-16.
14. Krook A, O'Rahilly S. Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996; 10 (1): 97-122.
15. Maassen JA, LM TH, Van Essen E, Heine RJ, Nijpels G, Jahangir Tafrechi RS, y cols. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes* 2004; 53 (Supl. 1): S103-9.
16. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 2001; 414 (6865): 788-91.
17. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265 (5181): 2037-48.
18. Goto Y, Kakizaki M. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med* 1976; 119: 85-90.
19. Miralles F, Portha B. Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50 (Supl.) 1: S84-8.
20. Galli J, Li LS, Glaser A, Ostenson CG, Jiao H, Fakhrai-Rad H, y cols. Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nat Genet* 1996; 12 (1): 31-7.
21. Gauguier D, Froguel P, Parent V, Bernard C, Bihoreau MT, Portha B y cols. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat Genet* 1996; 12 (1): 38-43.
22. Galli J, Fakhrai-Rad H, Kamel A, Marcus C, Norgren S, Luthman H. Pathophysiological and genetic characterization of the major diabetes locus in GK rats. *Diabetes* 1999; 48 (12): 2463-70.
23. Gill-Randall RJ, Adams D, Ollerton RL, Alcolado JC. Is human Type 2 diabetes maternally inherited? Insights from an animal model. *Diabet Med* 2004; 21 (7): 759-62.
24. Janssen U, Phillips AO, Floege J. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes. *J Nephrol* 1999; 12 (3): 159-72.
25. Murakawa Y, Zhang W, Pierson CR, Brismar T, Ostenson CG, Efendic S y cols. Impaired glucose tolerance and insulinopenia in the GK-rat causes peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18 (6): 473-83.
26. Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Sekine Y, Honmura S, Matsuo K y cols. Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia* 1997; 40 (6): 726-30.
27. Bielschowsky M, Bielschowsky F. A new strain of mice with hereditary obesity. *Proc Univ Otago Med Sch* 1953; 31: 29-31.
28. Reifsnyder PC, Churchill G, Leiter EH. Maternal environment and genotype interact to establish diabetes in mice. *Genome Res* 2000; 10 (10): 1568-78.
29. Veroni MC, Proietto J, Larkins RG. Evolution of insulin resistance in New Zealand obese mice. *Diabetes* 1991; 40 (11): 1480-7.
30. Nakamura M, Yamada K. Studies on a diabetic (KK) strain of the mouse. *Diabetologia* 1967; 3 (2): 212-21.
31. Ikeda H. KK mouse. *Diabetes Res Clin Pract* 1994; 24 (Supl.): S313-6.
32. Gohda T, Makita Y, Shike T, Tanimoto M, Funabiki K, Hori-koshi S y cols. Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a Type 2 diabetes model: is Zn-alpha2 glycoprotein-1 a candidate gene for obesity? *Diabetes* 2003; 52 (8): 2175-81.

33. Shike T, Hirose S, Kobayashi M, Funabiki K, Shirai T, Tomino Y. Susceptibility and negative epistatic loci contributing to type 2 diabetes and related phenotypes in a KK/Ta mouse model. *Diabetes* 2001; 50 (8): 1943-8.
34. Ziv E, Shafir E, Kalman R, Galer S, Bar-On H. Changing pattern of prevalence of insulin resistance in *Psammomys obesus*, a model of nutritionally induced type 2 diabetes. *Metabolism* 1999; 48 (12): 1549-54.
35. Marquie G, Hadjiisky P, Arnaud O, Duhault J. Development of macroangiopathy in sand rats (*Psammomys obesus*), an animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of gliclazide. *Am J Med* 1991; 90 (6A): 55S-61S.
36. Cerasi E, Kaiser N, Gross DJ. From sand rats to diabetic patients: is non-insulin-dependent diabetes mellitus a disease of the beta cell? *Diabetes Metab* 1997; 23 (Supl. 2): 47-51.
37. Heled Y, Shapiro Y, Shani Y, Moran DS, Langzam L, Braiman L y cols. Physical exercise prevents the development of type 2 diabetes mellitus in *Psammomys obesus*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282 (2): E370-5.
38. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992; 41 (11): 1422-8.
39. Schwartz GJ, Whitney A, Skoglund C, Castonguay TW, Moran TH. Decreased responsiveness to dietary fat in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats lacking CCK-A receptors. *Am J Physiol* 1999; 277 (4 Pt 2): R1144-51.
40. Bi S, Moran TH. Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat. *Neuropeptides* 2002; 36 (2-3): 171-81.
41. Shima K, Shi K, Mizuno A, Sano T, Ishida K, Noma Y. Exercise training has a long-lasting effect on prevention of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats. *Metabolism* 1996; 45 (4): 475-80.
42. Ishida K, Mizuno A, Sano T, Noma Y, Shima K. Effect of timely insulin administration on pancreatic B-cells of Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty (OLETF) strain rats. An animal model of non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Horm Metab Res* 1995; 27 (9): 398-402.
43. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ y cols. 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 (3): 491-5.
44. Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284 (6): F1138-44.
45. Like AA, Lavine RL, Poffenbarger PL, Chick WL. Studies in the diabetic mutant mouse. VI. Evolution of glomerular lesions and associated proteinuria. *Am J Pathol* 1972; 66 (2): 193-224.
46. Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L y cols. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 1996; 271 (5251): 994-6.
47. Miltenberger RJ, Mynatt RL, Wilkinson JE, Woychik RP. The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome. *J Nutr* 1997; 127 (9): 1902S-1907S.
48. Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, Barsh GS. Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum Mol Genet* 1995; 4 (2): 223-30.
49. Mynatt RL, Miltenberger RJ, Klebig ML, Zemel MB, Wilkinson JE, Wilkinson WO y cols. Combined effects of insulin treatment and adipose tissue-specific agouti expression on the development of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94 (3): 919-22.
50. Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *J. Hered.* 1961; 52: 275-278.
51. Griffen SC, Wang J, German MS. A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes* 2001; 50 (1): 63-8.
52. Muller S, Cleary MP. Glucose metabolism in isolated adipocytes from ad Libitum- and restricted-fed lean and obese Zucker rats at two different ages. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 187 (4): 398-407.
53. Lash JM, Sherman WM, Hamlin RL. Capillary basement membrane thickness and capillary density in sedentary and trained obese Zucker rats. *Diabetes* 1989; 38 (7): 854-60.
54. Terrettaz J, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. Severe hepatic and peripheral insulin resistance as evidenced by euglycemic clamps in genetically obese fa/fa rats. *Endocrinology* 1986; 118 (2): 674-8.
55. Stojanovska L, Rosella G, Proietto J. Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol* 1990; 258 (5 Pt 1): E748-56.
56. Zhao G, Zhang X, Smith CJ, Xu X, Ochoa M, Greenhouse D y cols. Reduced coronary NO production in conscious dogs after the development of alloxan-induced diabetes. *Am J Physiol* 1999; 277 (1 Pt 2): H268-78.
57. Bono VH, Jr. Review of mechanism of action studies of the nitrosoureas. *Cancer Treat Rep* 1976; 60 (6): 699-702.
58. Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 1998; 47 (1): 50-6.
59. Zahner D, Malaisse WJ. Kinetic behaviour of liver glucokinase in diabetes. I. Alteration in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes Res* 1990; 14 (3): 101-8.
60. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002; 512 (2-3): 121-34.
61. Yang Z, Chen M, Fialkow LB, Ellett JD, Wu R, Nadler JL. The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas* 2003; 26 (4): e99-104.
62. Mensah-Brown EP, Stolic Grujic S, Maksimovic D, Jasima A, Shahin A, Lukic ML. Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes. *Mol Immunol* 2002; 38 (12-13): 941-6.
63. Muller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology* 2002; 205 (1): 35-50.
64. Holstad M, Sandler S. A transcriptional inhibitor of TNF-alpha prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice. *J Autoimmun* 2001; 16 (4): 441-7.
65. Reddy S, Wu D, Elliott RB. Low dose streptozotocin causes diabetes in severe combined immunodeficient (SCID) mice without immune cell infiltration of the pancreatic islets. *Autoimmunity* 1995; 20 (2): 83-92.
66. Portha B, Blondel O, Serradas P, McEvoy R, Giroix MH, Kergoat M, y cols. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabetes Metab* 1989; 15 (2): 61-75.
67. García C, Arias-Díaz J, Villa N, Trueba V, Balibrea JL, Vara E. Islets from neonatally streptozotocin treated rats display an increased in vitro sensitivity to tumour necrosis factor. *Diabetologia* 1994; 37 (Supl. 1): A96.
68. Plum L, Wunderlich FT, Baudler S, Krone W, Bruning JC. Transgenic and knockout mice in diabetes research: novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. *Physiology (Bethesda, Md)* 2005; 20: 152-61.
69. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T y cols. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994; 372 (6502): 182-6.
70. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S y cols. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391 (6670): 900-4.