

MODELS ANIMALS PER A L'ESTUDI DE LA DIABETIS

NÚRIA ROGLANS, MARTA ALEGRET I JUAN CARLOS LAGUNA

*Unitat de Farmacologia, Departament de Farmacologia i Química Terapèutica,
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona
Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona
Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición*

Adreça per a la correspondència: Juan Carlos Laguna Egea. Unitat de Farmacologia, Departament de Farmacologia i Química Terapèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 643. 08028 Barcelona. Tel.: 934 024 530. Adreça electrònica: jclagunae@ub.edu.

RESUM

La diabetis mellitus (DM) s'origina per manca dels efectes de la insulina, bé perquè el pàncrees és incapaç de produir-ne, bé perquè els seus òrgans diana no responen adequadament, o per una combinació d'ambdues situacions, amb l'aparició d'hiperglucèmia, poliúria i polidípsia. En absència total de la insulina (DM tipus 1) hi ha metabolisme accelerat de proteïna muscular i greix, que pot acabar en cetoacidosi metabòlica i mort. Amb activitat insulínica residual (DM tipus 2), la malaltia es cronifica, amb obesitat, micro i macroangiopaties, i les seves manifestacions clíniques (insuficiència renal, alteracions retinals, neuropaties, infart de miocardi, etc.). La DM és un problema sanitari de primer ordre i, en ser una malaltia complexa, en la qual intervenen factors genètics i adquirits, no hi ha un model animal perfecte per estudiar-la que reproduïxi totes les característiques de la malaltia humana. La majoria de models utilitzen rosegadors, per una sèrie d'avantatges: petita grandària, facilitat d'obtenció, ràpid recanvi generacional i facilitat de manipulació genètica. En aquesta revisió parlarem de models induïts, en els quals reproduïm la malaltia mitjançant una manipulació determinada, models espontanis, consistents en soques d'animals que s'han seleccionat genèticament al llarg de successives generacions per tal que manifestin la malaltia, i models obtinguts per modificació genètica.

Paraules clau: diabetis, model experimental, insulina, resistència a la insulina.

ANIMAL EXPERIMENTAL MODELS FOR THE STUDY OF DIABETES

SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) originates from a lack of insulin effects, due to a deficit of pancreatic production, or to an inadequate response of target organs, or a combination of both situations, ensuing hyperglycaemia, polyuria and polydipsia. When insulin is totally absent (Type 1 DM), there is an increased metabolism of muscular protein and fat, ending in metabolic ketoacidosis and death. With a residual insulin activity (Type 2 DM), diabetes becomes chronic, with obesity, micro- and macroangiopathies and their corresponding clinical manifestations (renal failure, retinal alterations, neuropathies, myocardial infarct, etc.). DM is a serious health problem and, as it is a complex illness, in which participate genetic and acquired factors, there is not a single perfect animal model for its study, able to reproduce all the characteristics of the human malady. The great majority of models use rodents, given their advantages: small size, easy access, fast reproduction rate, and a feasible genetic manipulation. We will discuss about induced models, in which the illness is reproduced by means of a specific manipulation, spontaneous models, comprised by animal breeds genetically selected along successive generations in order to them to develop the malady, and genetically engineered models.

Key words: diabetes, experimental model, insulin, insulin resistance.

INTRODUCCIÓ

Aquesta revisió pretén fer una recopilació senzilla i entenedora dels models animals que s'han utilitzat al llarg dels anys en els laboratoris de recerca arreu del món per tal d'esbrinar a escala cel·lular i molecular les característiques de la diabetis mellitus, sempre amb el punt de mira final de trobar noves eines terapèutiques que permetin el control d'aquesta malaltia. Des que l'any 1922 Banting i Best (Banting i Best, 1922) van demostrar que l'administració d'extractes de pàncrees a gossos als quals s'havia extirpat aquest òrgan normalitzava les concentracions sanguínies de glucosa, els animals d'experimentació han contribuït de manera incalculable a la millora de les expectatives i la qualitat de vida dels malalts de diabetis. Abans de passar a la descripció dels diversos models animals existents, farem un resum dels co-

neixements actuals sobre la malaltia. Val a dir que per a l'obtenció de molts d'aquests coneixements, especialment aquells relacionats amb les bases moleculars de la malaltia, la utilització de models animals ha estat imprescindible. En la mesura del possible, citarem fonts d'informació en forma de revisions o compendis sobre els diversos temes, de manera que aquells lectors que hi vulguin aprofundir puguin trobar una bona base de partida sobre la qual puguin iniciar la seva cerca.

DIABETIS MELLITUS

La diabetis mellitus és un trastorn crònic del metabolisme energètic de l'organisme que s'origina per una mancança dels efectes d'una hormona pancreàtica, la insulina. Aquesta mancança s'origina bé perquè el pàncrees és incapaç de produir-ne,

bé perquè els òrgans que responen als efectes de la insulina (bàsicament fetge, múscul esquelètic i teixit adipós) no ho fan adequadament, o per una combinació de totes dues situacions. L'efecte més immediat del dèficit d'insulina és l'elevació de les concentracions a la sang de glucosa, el que es coneix com a hiperglucèmia (més de 7 mM en dejú o més d'11,1 mM dues hores després d'un àpat). L'excés de glucosa en sang fa que aquesta es perdi per l'orina, situació que es coneix com a glucosúria, i que no es produeix en persones sanes. La glucosa en orina arrossega una gran quantitat d'aigua, que incrementa el volum d'orina produït (poliúria) i produeix una deshidratació de l'organisme, que es tradueix en un augment de la ingestió de líquids o polidipsia. Com que les cèl·lules de l'organisme no utilitzen la glucosa a causa de la manca d'insulina, per produir energia vital destrueixen proteïnes, cosa que condueix a una pèrdua progressiva de massa muscular, i greixos. Si aquest últim fenomen, el metabolisme excessiu dels greixos, es produeix de manera intensa i continuada, per una absència total d'insulina a l'organisme, l'acumulació en la sang de greixos parcialment metabolitzats, coneguts com a cossos cetònics (vulgarment *acetona*), pot induir una acidificació de la sang. Aquesta situació, anomenada *cetoacidosi diabètica*, constitueix una urgència mèdica que, si no es corregeix ràpidament, pot arribar a ser mortal. A llarg termini, l'alteració continuada del metabolisme afecta els vasos sanguinis, i condueix a l'aparició de macroangiopaties (quan s'afecten vasos sanguinis de gran calibre) i microangiopaties (afectació de vasos de petit calibre). La macroangiopatia comporta una acceleració en la formació de placa d'ateroma a la paret de les grans artèries, que incrementa progressivament el risc de patir un accident cardiovascular relacionat, com infart de miocar-

di. La microangiopatia afecta primordialment la retina, els ronyons i els nervis perifèrics i, a la llarga, pot conduir a l'aparició d'insuficiència renal o ceguesa. Totes dues situacions redueixen enormement les expectatives i la qualitat de vida del pacient diabètic. Des del punt de vista de la causa inicial que origina la malaltia, podem parlar de dos tipus de diabetis:

Diabetis mellitus de tipus 1 (DMT1), produïda per una reacció autoimmunitària que destrueix les cèl·lules pancreàtiques productores d'insulina. En absència de tractament insulínic substitutiu, apareix ràpidament cetoacidosi diabètica, que condueix a la mort del pacient.

Diabetis mellitus de tipus 2 (DMT2), que moltes vegades s'associa a obesitat, relacionada amb la hiperinsulinèmia crònica. D'aparició més insidiosa en el temps, es deu a un defecte dels teixits diana de la insulina (fetge, múscul esquelètic i teixit adipós), que dificulta la manifestació dels efectes d'aquesta hormona, fenomen anomenat *resistència a la insulina*, moltes vegades associat a una alteració en la secreció d'insulina. A l'inici de la malaltia, el pàncrees reacciona produint més quantitat d'insulina, per contrarestar aquesta resistència tissular, de manera que no és estrany trobar pacients amb DMT2 amb concentracions anormalment elevades d'insulina en sang (hiperinsulinèmia). Amb els anys, el pàncrees esgota la seva capacitat de produir insulina, i apareix hipoinsulinèmia, de manera que molts pacients que s'han mantingut estables amb dieta i tractament amb fàrmacs com els hipoglucemiants orals o els sensibilitzadors a la insulina, necessiten finalment l'administració d'insulina exògena per al control adequat de la malaltia. La incidència de diabetis mellitus està arribant a proporcions pandèmiques, amb una estimació de 151 milions de casos l'any 2000 (Engelgau, 2003) i previsions de 500

milions de casos per a l'any 2025 (Hansen, 1999), concentrats especialment als EUA, la Xina i l'Índia (King, 1998). D'aquests casos, aproximadament un 90-95 % són de DMT2. Encara que al segle passat la gran majoria de casos diagnosticats de DMT2 eren en pacients d'edats superiors als cinquanta anys, cada vegada els nous casos diagnosticats de DMT2 es presenten en pacients més joves (Drake, 2002), cosa que incrementa el risc de manifestacions patològiques micro i macroangiopàtiques amb els anys. Per tant, la diabetis mellitus és, avui dia i en un futur pròxim, un problema sanitari de primer ordre.

MODELS ANIMALS DE DIABETIS MELLITUS: CONSIDERACIONS GENERALS

La diabetis mellitus és una malaltia complexa, multifactorial, en la qual intervenen factors genètics i adquirits, especialment relacionats amb els hàbits dietètics i l'estil de vida de cada individu. Per tant, és evident que no hi ha un model animal perfecte, que representi i reproduïxi totes les característiques de la malaltia humana; en molts casos, se solen utilitzar diversos models animals complementaris, a fi d'obtenir dades experimentals que s'apropin el més possible a la situació humana. Encara que s'utilitzen diverses espècies de mamífers en l'estudi de la diabetis, com gossos, simis, etc., una gran majoria de models experimentals utilitzen espècies de rosegadors, ratolins o rates, per una sèrie d'avantatges evidents: petita grandària, cosa que redueix les despeses d'estabulació i en facilita la manipulació, facilitat d'obtenció, ràpid recanvi generacional i facilitat de manipulació genètica, especialment en ratolins. De manera general, parlarem de tres tipus bàsics de models experimentals:

models induïts, en el quals provoquem la malaltia en l'animal d'experimentació mitjançant una intervenció quirúrgica, l'administració d'una toxina determinada, una dieta específica o una combinació d'aquestes possibilitats; models espontanis, consistents en soques d'animals que s'han seleccionat genèticament al llarg de successives generacions per tal que manifestin la malaltia o alguna de les seves característiques; en aquest sentit, el procés condueix a un enriquiment de gens i fenotips que no han d'estar necessàriament implicats tots en la producció de la malaltia. Finalment, el tercer tipus comprèn animals modificats genèticament, per ablació o sobreexpressió de gens o combinacions de gens, que estan contribuint enormement al desxiframent de les bases moleculars de la diabetis. Per a una informació més extensa i detallada sobre el tema, referirem el lector a les excel·lents monografies de MacNeil (1999) i Sima i Shafrir (2001); pel que fa a models que representin les complicacions vasculars associades a la diabetis, és molt interessant la revisió de Thompson (2008). En la taula 1 es presenta un resum dels diversos models experimentals de diabetis induïts i espontanis.

MODELS ANIMALS DE DMT1

Com ja hem comentat, la DMT1 es caracteritza per l'absència total de producció d'insulina, a causa d'una reacció autoimmunitària que destrueix les cèl·lules productores pancreàtiques. Un dels primers models de diabetis mellitus utilitzats, el gos amb el pàncrees extirpat de Banting i Best (1922), és, de fet, un model de DMT1 induït quirúrgicament. Avui dia s'utilitza més com a model induït la destrucció química de les cèl·lules pancreàtiques de rata per administració d'estreptozotocina, un

TAULA 1. Classificació dels models animals de diabetis, excloent-hi els models obtingut per modificació genètica

Tipus de Model	DMT1	DMT2
Induït	Extirpació pancreàtica Administració d'estreptozotocina	Dietes riques en greixos Estreptozotocina neonatal Corticosteroides Ratolí ALS/Lt més alloxà
Espontanis		
Anàlegs	Ratolí NOD Rata BB	Ratolí NZO Ratolí KK Ratolí NSY Ratolí TSOD Ratolí M16 Rata GK Rata OLEFT Rata Cohen Rata de la sorra o del desert Macaco Rhesus Ratolins <i>db/db</i> i <i>ob/ob</i> Ratolí Akita Ratolí Agouti Rates ZF i ZDF Rates SHR/N-cp i JCR/LA-cp
Intrínsecs		

antibiòtic d'ampli espectre amb activitat alquilant. L'estructura molecular d'aquest compost, que conté una molècula de glucosa, fa que sigui internalitzada pels transportadors cel·lulars de glucosa i es centri de manera massiva en les cèl·lules pancreàtiques productores d'insulina, on produeix l'efecte tòxic (Arias-Díaz, 2007). Encara que una dosi única massiva d'estreptozotocina pot induir diabetis en rates, és més freqüent utilitzar una dosificació múltiple a dosis petites (40 mg/dia en cinc dies consecutius), que produeix una insulino-pènia en la qual participa una certa reacció autoimmunitària al pàncrees. En qual-sevol cas, la participació del sistema immunitari en els models induïts, a diferència de la malaltia humana, és mínima. Molt més utilitzats són els models espontanis de DMT1, com el conill blanc New Zealand, el gos Keeshond i, especialment, el ratolí NOD (*non-obese diabetic*) i la rata BB (*bio breeding*). En aquests dos models hi ha una participació autoimmunitària en la

producció de la malaltia, amb atac per part de limfòcits B i T, així com macròfags i cèl·lules NK (*natural killer*), al teixit pancreàtic. En conseqüència, l'administració preventiva de fàrmacs immunosupressors a aquests animals retarda de manera manifesta l'aparició de la DMT1 (Rees, 2005).

Ratolins NOD

Aquests ratolins, caracteritzats fa més de vint-i-cinc anys, presenten a les 4-5 setmanes de vida hipoinsulinèmia per destrucció progressiva espontània de les cèl·lules β -pancreàtiques productores d'insulina, que es manifesta en forma de clara malaltia diabètica entre les dotze i trenta setmanes de vida. Encara que les manifestacions de la malaltia en aquest model són molt similars a la malaltia humana, s'ha d'indicar que els ratolins NOD no solen presentar una cetoacidosi molt marcada, per la qual cosa poden sobreviure un temps considerable

(setmanes) sense l'administració d'insulina exògena.

Rata BB

Aquesta soca de rates deu el seu nom al laboratori comercial, Bio Breeding Laboratories, d'Ottawa, Canadà, que la va caracteritzar primer l'any 1974. Al voltant de les dotze setmanes de vida, aquestes rates manifesten pèrdua de pes, poliúria, poli-dípsia, hiperglucèmia i insulinopènia, i, a diferència dels ratolins NOD, cetoacidosi severa que necessita l'administració immediata d'insulina.

En els darrers anys, s'està incrementant la utilització de models d'animals modificats genèticament per a l'estudi de la DMT1. Entre aquests podríem citar el ratolí OVE26, en el qual s'ha induït la sobreexpressió del gen de la calmodulina en les cèl·lules pancreàtiques productores d'insulina. Com a resultat d'aquesta modificació, els animals desenvolupen hiperglucèmia, hipoinsulinèmia i hipertriglicèrèmia. Aquest model es pot induir en el ratolí NOD, i produeix una alteració diabètica molt més intensa que la que presenta el ratolí NOD no modificat. Igualment, es pot induir DMT1 amb estreptozotocina en un model modificat genèticament; és el cas, per exemple, de la rata (mRen-2)27, hipertensa per sobreexpressió del sistema renina-angiotensina, o el ratolí HuBtg, que expressa l'apolipoproteïna B humana (Thompson, 2008).

MODELS ANIMALS DE DMT2

La DMT2 es presenta de manera espontània en diverses espècies de mamífers, tant en animals de companyia com de ramaderia, i molts dels models utilitzats avui

dia en la recerca de la DMT2 manifesten una complexitat i una heterogeneïtat similar a la presentada per la malaltia humana. Per a una informació més extensa, el lector es pot adreçar a les revisions de Chen i Wang (2005), Masiello (2006), Srinivasan i Ramarao (2007) i Nugent *et al.* (2008).

Models induïts de DMT2

Tradicionalment s'han utilitzat models induïts de DMT2 per administració de dieta, sobre tot dieta rica en greixos (bàsicament en ratolins de la soca C57BL/6J), fàrmacs i toxines, especialment els corticosteroides i, de nou, l'estreptozotocina. El model de DMT2 induïda per administració de dosis elevades i sostingudes de corticosteroides a animals d'experimentació com la rata és idoni per a l'estudi de la DMT2 humana induïda precisament per tractament amb corticosteroides durant llargs períodes de temps, com és el cas de la immunosupressió associada als trasplantaments d'òrgans. En el cas de l'estreptozotocina, s'ha demostrat que l'administració a animals d'experimentació (rates, gossos, etc.) en el període neonatal predisposa l'animal a patir DMT2 en l'edat adulta, atès que la recuperació pancreàtica dels animals tractats amb la toxina és incompleta. Recentment s'ha caracteritzat una soca de ratolí (ALS/Lt) altament susceptible a l'al·loxà, una molècula tòxica per a les cèl·lules pancreàtiques productores d'insulina. Els mascles d'aquesta soca poden manifestar hiperinsulinèmia i intolerància a la glucosa a les 6-8 setmanes de vida sense necessitat d'administrar la toxina. De totes maneres, avui dia s'està estenent enormement la utilització de models d'inducció de DMT2 no tradicionals, per modificació genètica, dels quals parlarem posteriorment.

Models espontanis de DMT2

Entre els models espontanis de DMT2 val la pena diferenciar entre models anàlegs i models intrínsecs. Els primers són models constituïts pel tipus clàssic de selecció genètica al llarg de generacions, que condueix a l'establiment de soques d'animals que manifesten de manera espontània, per un enriquiment d'alteracions genètiques diverses i, moltes vegades, desconegudes, una malaltia molt similar, si no idèntica, a la humana. Els models intrínsecs, al contrari, desenvolupen la simptomatologia de DMT2 per una mutació específica, puntual, en un gen determinat. Encara que la malaltia humana és, com ja hem comentat, de naturalesa poligènica, els models espontanis intrínsecs ens permeten establir recerques específiques sobre determinades molècules o vies metabòliques i establir-ne el paper determinant o no en la malaltia humana (Arias-Díaz, 2007).

Entre els models espontanis anàlegs de DMT2 podem destacar els següents:

Rata Goto-Kakizaki (GK). Aquest model, desenvolupat al Japó a la dècada dels noranta del segle passat a partir de rates de la soca Wistar amb nivells de glucosa plasmàtics en el límit de la normalitat, és un dels que millor reproduceix la malaltia humana, i presenta igualment complicacions renals, retinals i als nervis perifèrics. Així mateix, l'estudi d'aquesta soca ha permès determinar que la hiperglicèmia *in utero* induïx un desenvolupament pancreàtic anormal que facilita l'aparició de DMT2 a l'edat adulta.

Ratolí New Zealand obès (NZO). Aquests ratolins presenten, des del seu naixement, obesitat per hipertròfia de les cèl·lules del teixit adipós, associada a resistència a la insulina, i no manifesten hiperglicèmia fins a les setze setmanes de vida.

Ratolí KK (Kuo-Kondo). Aquesta soca, també originada al Japó, és, juntament amb la rata GK, una de les que reproduceix la malaltia humana amb més fidelitat. Originada per l'encreuament continuat de ratolins propensos a l'obesitat, els ratolins KK adquireixen de manera progressiva, en fer-se adults, obesitat, resistència a la insulina als teixits perifèrics, i hiperinsulinèmia de compensació que no pot evitar l'aparició d'una hiperglicèmia moderada. És interessant destacar que la disseminació i manteniment d'aquesta soca en laboratoris arreu del món ha produït, al llarg dels anys, una deriva genètica que fa que hi hagi, avui dia, soques de ratolins KK diferenciades genotípicament i fenotípicament. Aquestes diferències poden ser la causa de la falta de concordança en els resultats experimentals observada en treballs publicats per diversos laboratoris que utilitzen, teòricament, el mateix model de ratolí KK.

Ratolí NSY (Nagoya-Shibata-Yasuda). Aquest model deriva, per selecció genètica, de la mateixa soca de ratolí que va originar el ratolí NOD, model de DMT1, la soca Jc1:ICR. Aquests animals desenvolupen DMT2 de manera espontània amb l'edat, presenten una resistència dels teixits perifèrics a la insulina moderada i una secreció pancreàtica d'insulina defectiva, sense manifestar una obesitat gaire marcada. És un dels models que presenta, a diferència del que passa en humans, un dimorfisme sexual molt marcat respecte a la malaltia; pràcticament el 100 % dels mascles desenvolupen la malaltia, per un 30 % de les femelles.

Ratolí TSOD (Tsumara Suzuki obese diabetes). Aquesta soca, de caracterització recent, desenvolupa polidipsia i poliúria a les vuit setmanes d'edat, i apareixen progressivament hiperglicèmia, hiperinsulinèmia i obesitat, bàsicament en els ratolins mascles.

Ratolí M16. També de caracterització recent, aquests ratolins desenvolupen ràpidament, abans de les vuit setmanes d'edat, obesitat acompanyada d'hiperfàgia, hiperinsulinèmia i hiperglicèmia en tots dos sexes.

Rata de la sorra o del desert (Psammomys obesus). Aquest rosegador, que no és estrictament una rata, sinó una espècie de jerbu, constitueix de fet una barreja entre un model induït i espontani de DMT2. Quan es manté alimentada en condicions de captivitat amb la seva dieta habitual, constituïda per vegetació del desert, la rata de sorra es manté sana, sense manifestar cap malaltia metabòlica. No obstant això, si se li subministra la dieta habitual de laboratori per a rates, molt més energètica, desenvolupa ràpidament obesitat, resistència perifèrica a la insulina i hiperglicèmia i, si la dieta subministrada conté colesterol, franca hiperlipèmia que condueix a l'aparició d'arteriosclerosi. És, per tant, un bon model per a l'estudi de la influència de la dieta i l'exercici físic en el desenvolupament de la DMT2. Un model no tan utilitzat, però que reacciona de manera similar a la dieta de laboratori, és el ratolí espinós (*Acomys calirinus*), espècie també originària d'ambients desèrtics i esteparis.

Rata OLEFT (Otsuka Long-Evans Takashi-ma fatty rat). Al 1984, als estabularis de la companyia farmacèutica Otsuka, es va identificar, dintre d'una colònia de rates de la soca Long Evans, uns individus que desenvolupaven de manera espontània diabetis. Aquests animals van ser els fundadors de la línia de rates OLEFT que utilitzem avui dia. Les rates adultes d'aquesta soca, especialment els mascles, manifesten una obesitat discreta, poliúria, polidípsia, hiperglicèmia i hiperinsulinèmia. Amb la progressió de la malaltia sol aparèixer nefropatia diabètica i alteracions, i finalment atròfia dels illots pancreàtics productors

d'insulina, en un procés temporal molt similar al que es produeix en la DMT2 humana. Les rates OLEFT es caracteritzen, a més, per presentar alteracions en l'expressió del gen de la colecistocinina A i de les vies de senyalització de la sensació de sacietat al sistema nerviós central, cosa que facilita la ingesta energètica excessiva i l'aparició d'obesitat.

Rata Cohen diabètica. Els animals sensibles d'aquesta soca desenvolupen DMT2 sense obesitat quan s'alimenten amb una dieta rica en carbohidrats.

Macaco Rhesus (Macaca mullata). Aquests simis, en condicions d'establació i amb dieta *ad libitum*, desenvolupen amb els anys obesitat, hiperinsulinèmia i resistència perifèrica a la insulina, amb fallida final de secreció d'insulina al pàncrees.

Com a models de DMT2 de naturalesa espontània i intrínseca destacarem:

Ratolí db/db. Aquests ratolins presenten una mutació puntual en el gen *db* (gen de la diabetis) que codifica la proteïna receptora d'una hormona sintetitzada al teixit adipós, la leptina. La mutació, que es transmet de manera autosòmica recessiva, implica una mancança de transmissió del senyal de la leptina que condueix a l'aparició d'una simptomatologia similar a la de la DMT2 humana. Inicialment, els ratolins *db/db* presenten hiperglicèmia i hiperinsulinèmia, amb increment de pes evident. A les 20-26 setmanes d'edat, apareix degeneració pancreàtica, amb hipoinsulinèmia i pèrdua progressiva de pes corporal. Aquesta situació pot retardar-se en substituir la dieta normal amb una dieta hiperproteica, pràcticament desproveïda de carbohidrats, que redueix l'estrès secretori d'insulina imposat sobre el pàncrees.

Ratolí ob/ob. En aquest cas, la mutació afecta el gen mateix de la leptina, de manera que aquesta hormona no és detectable en el plasma d'aquests ratolins. El ratolí

ob/ob presenta clara obesitat, però símptomes diabètics molt menys accentuats que el ratolí *db/db*. La manca de leptina també indueix hipercortisolisme en aquests animals, cosa que afavoreix les manifestacions de resistència a la insulina.

Ratolí Akita. Aquest ratolins presenten una mutació, també coneguda com a *Mody*, que impedeix una secreció d'insulina adequada, i manifesten signes de DMT2 (polidipsia i poliúria) sense obesitat a les 3-4 setmanes de vida.

Ratolí Agouti o KK/Ay. La proteïna codificada pel gen *agouti* (*Ay*) afecta el metabolisme dels melanòcits de la pell, induint una coloració groguenca; conjuntament, l'expressió d'aquest gen també controla l'activitat hipotalàmica implicada en el control del pes corporal. Els ratolins homozigots per al gen *agouti* no són viables; els animals heterozigots presenten manifestacions clíniques de la malaltia a les vuit setmanes de vida amb manifestacions fenotípiques complexes, amb pigmentació groguenca, obesitat i resistència a la insulina. La transcendència d'aquest model està en el fet que el gen *agouti* també s'expressa en el teixit adipós humà, en el qual sembla que participa en el control del metabolisme energètic.

Rata Zucker (falfa). En la rata, el gen recessiu *fa* codifica un receptor de la leptina defectuós, no funcional, de manera que els animals homozigots per a aquest gen presenten obesitat, ja manifesta a les quatre setmanes de vida, hipertrigliceridèmia, hipercolesterolèmia, hiperglucèmia moderada i hiperinsulinèmia. Aquest gen va ser identificat per Zucker i Zucker el 1961 (Zucker i Zucker, 1961), i per això el nom del model. Les rates Zucker (*fa/fa*) presenten obesitat mòrbida (la matèria grassa pot representar més del 40 % de la composició corporal de l'animal adult), relacionada amb la resistència a la insulina al fetge i el

teixit muscular. Dins les rates Zucker, algunes soques presenten un defecte associat en la funcionalitat de les cèl·lules productores d'insulina pancreàtiques, de manera que aquests animals amb el temps perden la capacitat de secretar insulina i necessiten teràpia amb insulina per sobreviure. Per aquestes raons, moltes vegades aquestes soques són anomenades de manera específica com el model de rata ZDF (*Zucker diabetic fatty*).

Rata SHR/N-cp (Spontaneously Hypertensive Rat/NIH-corpulent). Els mascles d'aquesta soca de rata, homozigots per al gen *corpulent* (*cp*), representen un model de l'associació d'obesitat amb hiperfàgia, DMT2 i hipertensió. El gen *cp* codifica un receptor a la leptina no funcional.

Rata JCR/LA-cp (James C. Russel/LA-cp). Els mascles homozigots per al gen *cp* d'aquesta soca manifesten una malaltia similar a la de la rata SHR/N-*cp*, però sense presentar hipertensió. Aquest model, amb el temps, desenvolupa, de manera similar als humans, alteracions vasculars i cardíques.

Els models espontanis, i alguns dels models induïts de DMT2 poden reagrupar-se en una altra classificació, en funció de si presenten unes cèl·lules pancreàtiques productores d'insulina «làbils» o «resistents» (vegeu la taula 2). La transició en les diferents espècies animals que pateixen DMT2 d'un estat de resistència a la insulina compensat fins a la DMT2 florida, que necessita teràpia insulínica, normalment es produeix en quatre estadis ben diferenciats (Shafrir, 1999). En l'estadi inicial (*a*), els animals de pocs dies o joves són normoglicèmics i normoinsulinèmics. Amb el decurs del temps, comença a manifestar-se la resistència a la insulina en forma de més producció de glucosa hepàtica i menys captació de glucosa plasmàtica per part del múscul esquelètic; aquests animals, per

TAULA 2. Models de DMT2 classificats en funció de posseir cèl·lules β -pancreàtiques «làbils» o «resistents»

Tipus de model	Cèl·lules làbils	Cèl·lules resistents*
Induït	Estrepto-zootozina Ratolí ALS/Lt	Corticosteroides Models dietètics en ratolins
Espontanis		
Anàlegs	Ratolí NSY Rata GK Rata de la sorra o del desert Rata OLEFT Rata Cohen	Ratolí NZO Ratolí KK Ratolí TSOD Ratolí M16 Macaco Rhesus
Intrínsecs	Ratolí <i>db/db</i> Ratolí Akita Rates ZDF	Ratolí <i>ob/ob</i> Ratolí Agouti Rates ZF Rates SHR/N-cp i JCR/LA-cp

* Aquests models s'acompanyen d'obesitat manifesta, sobretot de tipus visceral.

mantenir la normoglicèmia, necessiten secretar concentracions d'insulina superiors a les habituals, i presenten hiperinsulinèmia (estadi *b*). Amb la progressió de la resistència a la insulina, la quantitat d'insulina secretada pel pàncrees no és suficient per mantenir la normoglicèmia, i es manifesta hiperglucèmia i hiperinsulinèmia (estadi *c*); normalment, els animals presenten en aquest estadi obesitat manifesta (el que els autors anglosaxons anomenen *diabesity*) i nivells elevats en plasma d'insulina no processada o proinsulina, reflex de l'estrès secretor al qual es veu sotmès el pàncrees. Finalment, les cèl·lules pancreàtiques col·lapsen i, en l'estat *d*, el pàncrees deixa de produir insulina, i apareix hiperglucèmia, hipoinsulinèmia i pèrdua progressiva de pes, fins a la instauració de cetoacidosis diabètica si no es tracta exògenament amb insulina. Dintre dels models animals existents, aquells que presenten cèl·lules pancreàtiques «resistents» no progressen a l'estadi *d*, i es mantenen de manera crònica en l'estadi *c*, amb hiperinsulinèmia, hiperglucèmia i obesitat. Al contrari, els models animals amb cèl·lules pancreàtiques «làbils» progressen amb el temps, més o menys ràpidament, a l'estadi *d*, i necessiten insulinoteràpia per sobre-

viure. Des d'aquest punt de vista, els models amb cèl·lules «làbils» mimetitzen millor la DMT2 en l'ésser humà, que, pràcticament en tots els casos, acaba amb fallida pancreàtica i insulinoteràpia. De fet, la DMT2 en l'ésser humà ha estat definida com «una fallida de les cèl·lules β -pancreàtiques per compensar la resistència a la insulina programada de manera genètica» (Polonsky, 1996).

Animals modificats genèticament per a l'estudi de la DMT2

Les tècniques de biologia molecular permeten, avui dia, utilitzant el ratolí com a base biològica, dissenyar pràcticament models «a demanda» per a l'estudi de la rellevància d'un gen determinat en la patofisiologia de la DMT2. Per a una descripció detallada dels diversos models utilitzats el lector podrà adreçar-se a les excel·lents revisions de Nandi *et al.* (2004), Biddinger i Kahn (2006), LeRoith i Gavrilova (2008), i LeRoith i Accilli (2006). Pràcticament totes les modificacions genètiques possibles s'han utilitzat en l'estudi de la DMT2; a continuació, farem una descripció breu i senzilla de cadascun dels possibles abor-

datges metodològics que han estat utilitzats.

Utilització de ratolins transgènics que sobreexpressen un gen determinat. Per obtenir aquests ratolins modificats, s'incorpora el gen que vulguem, o transgèn, al nucli d'un oòcit fertilitzat que, posteriorment, s'implantarà en una mare adoptiva. Atès que la incorporació en el genoma del transgèn és aleatòria, només una petita proporció dels oòcits fertilitzats donaran lloc a ratolins que sobreexpressin el gen. La interpretació dels resultats pot ser complicada pel fet que el transgèn pot, en incorporar-se al genoma, alterar l'expressió d'un gen nadiu, endogen, del ratolí; igualment, la càrrega genètica del ratolí «hoste» pot modificar els efectes de la introducció del transgèn, per la qual cosa és molt important considerar la soca de ratolí utilitzada per obtenir l'animal transgènic.

Utilització de ratolins en els quals s'ha eliminat un gen determinat (ratolins genoanullats), o bé s'ha introduït un gen alterat o que pertany a una altra espècie, normalment, un gen humà (genomodificats). Per això, s'elimina o altera el gen corresponent en cèl·lules troncales embrionàries que donaran lloc a animals quimèrics. Quan la modificació dóna lloc a un animal inviable, normalment perquè el gen alterat o eliminat és essencial per al desenvolupament fetal, es pot intentar evitar el problema fent el que es denominen genoanullacions o genomodificacions condicionals, en què es modifica el gen introduït de manera que només s'expressi en un teixit o tipus de cèl·lules determinades, sense que es vegin afectats la resta de teixits. Així, per exemple, s'han generat ratolins genoanullats per al receptor a la insulina en cada un dels teixits diàna de l'acció insulínica, fetge, múscul esquelètic i teixit adipós, així com en les cèl·lules pancreàtiques productores d'insulina mateixes, que han permès esbrinar

clarament la funció d'aquesta hormona en els teixits esmentats i les conseqüències de la manca.

S'ha d'indicar que els models genètics no són la panacea que soluciona tots els interrogants i també presenten problemes d'interpretació. Aquests problemes es relacionen majoritàriament amb l'aparició d'efectes suprafisiològics per la sobreexpressió de gens que, probablement, mai no es trobarien en individus sans i, fins i tot, patològics, i pels fenòmens de compensació. Aquest últim poden donar-se en els organismes genoanullats quan la carència del gen eliminat és substituïda per l'activitat d'un altre gen endogen compensatori. Un exemple el tenim en el cas del gen que codifica la proteïna IRS-1 o substrat del receptor de la insulina-1. Totes les dades que es posseïen sobre aquesta proteïna indicaven que és una molècula capital en la transmissió intracel·lular del senyal de la insulina, quan està activa al seu receptor. Per això, va ser molt decebedor observar que el primer ratolí genoanullat per a *IRS-1*, encara que presentava retard del creixement i hipertensió, només manifestava un cert grau d'intolerància a la glucosa, sense manifestar simptomatologia diabètica clara. El trencaclosques es va resoldre quan es va descobrir l'existència d'altres gens que codificaven d'altres proteïnes IRS i, en concret, el gen *IRS-2* era capaç pràcticament de suplir totes les missions d'*IRS-1* relacionades amb la sensibilitat a la insulina i l'activitat pancreàtica. En els ratolins genoanullats per a *IRS-1*, *IRS-2* se sobreexpressava de manera espontània i palliava parcialment l'absència del primer.

De la lectura d'aquesta revisió queda palesa l'extrema diversitat de models animals de diabetis, especialment en el cas de la DMT2. En un sentit estricte, qualsevol investigador interessat en l'estudi d'aquesta malaltia hauria d'utilitzar més d'un model

animal, de manera que els seus resultats, si fossin consistents en els diversos models utilitzats, tindrien més transcendència amb vista a la malaltia humana. En la pràctica, atès el cost i la durada de molts dissenys experimentals, molts grups d'investigació treballen amb un model determinat, en el qual tenen experiència i amb el qual, progressivament, van adquirint un coneixement més profund dels mecanismes moleculars implicats en la producció de la malaltia. Per tot això, caldria indicar, en el cas de la DMT2, que aquells models que desenvolupen els mateixos estadis de la malaltia humana, i acaben en fallida pancreàtica i necessitat d'insulinoteràpia, serien els més idonis per iniciar la recerca.

BIBLIOGRAFIA

- ARIAS-DÍAZ, J.; BALIBREA, J. (2007). «Modelos animales de intolerancia a la glucosa i diabetes tipo 2». *Nutr. Hosp.*, 22: 160-168.
- BANTING, F. G.; BEST, C. H. (1922). «The internal secretion of the pancreas». *J. Lab. Clin. Med.*, 7: 256-271.
- BIDDINGER, S. B.; RONALD KAHN, C. (2006). «From mice to men: Insights into the insulin resistance syndromes». *Annu. Rev. Physiol.*, 68: 121-158.
- CHEN, D.; WANG, M.-W. (2005). «Development and application of rodent models for type 2 diabetes». *Diabetes Ob. Metabol.*, 7: 307-317.
- DRAKE, A. J.; SMITH, A.; BETTS, P. R.; CROWNE, E. C.; SHIELD, J. P. H. (2002). «Type 2 diabetes in obese white children». *Arch. Dis. Child.* 86: 207-208.
- ENGELGAU, M. M.; NARAYAN, K. M. V.; SUDDINE, J. B.; VINICAR, F. (2003). «Addressing the burden of diabetes in the 21st century: better care and primary prevention». *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14: S88-91.
- HANSEN, B. C. (1999). «The metabolic syndrome X». *Ann. NY Acad. Sci.*, 892: 1-24.
- KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. (1998). «Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates and projections». *Diabetes Care*, 21: 1414-1431.
- LEROITH, D.; ACCILLI, D. (2008). «Mechanisms of disease: using genetically altered mice to study concepts of type 2 diabetes». *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, 4: 164-172.
- LEROITH, D.; GAVRILOVA, O. (2006). «Mouse models created to study the pathophysiology of type 2 diabetes». *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38: 904-912.
- MASIELLO, P. (2006). «Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic β -cell mass». *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38: 873-893.
- MCNEIL, J. H. (1999). *Experimental models of diabetes*. Florida: CRC Press LLC.
- NANDI, A.; KITAMURA, Y.; RONALD KAHN, C.; ACCILLI, D. (2004). «Mouse models of insulin resistance». *Physiol. Rev.*, 84: 623-647.
- NUGENT, D. A.; SMITH, D. M.; JONES, H. B. (2008). «A review of islet of Langerhans degeneration in rodent models of Type 2 diabetes». *Toxicol. Pathol.*, 36: 529-551.
- POLONSKY, K.; STURIS, J.; BELL, G. J. (1996). «Non-insulin-dependent-diabetes mellitus – A genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance». *N. England J. Med.*, 334: 777-783.
- REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. (2005). «Animal models of diabetes mellitus». *Diabet. Med.*, 22: 359-370.
- SHAFRIR, E.; ZIV, E.; MOSTHAF, L. (1999). «Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to β -cell failure in animal models». *Ann. NY Acad. Sci.*, 892: 223-246.
- SIMA, A. A. F.; SHAFRIR, E. (2001). *A primer on animal models of diabetes*. Amsterdam: Harwood Academic Press.
- SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. (2007). «Animal models in type 2 diabetes research: An overview». *Indian J. Med. Res.*, 125: 451-472.
- THOMPSON, C. S. (2008). «Animal models of Diabetes Mellitus: Relevance to vascular complications». *Curr. Pharm. Design*, 14: 309-324.
- ZUCKER, L. M.; ZUCKER, T. F. (1961). «Fatty, a new mutation in the rat». *J. Hered.*, 52: 275-278.