

Caracterización fenotípica gestacional de una cepa de rata Goto-Kakizaki

Julieta Sofía Fegatilli Fernández

Trabajo de Fin de Grado [2016- 2017]

Ciencias Ambientales



Tutora: Cristina Ripoll Orts

Área: Fisiología, Instituto de Bioingeniería

Tutor Externo: José Antonio Pérez de Gracia Hernández

Director del Servicio de Experimentación Animal

ÍNDICE

Resumen	4
I.Introducción	5
1.1 Modelos de experimentación animal en investigación	5
1.2. La Diabetes mellitus: una disfunción en la regulación de la glucemia	5
1.3. Modelos de experimentación de diabetes con hiperglucemia moderada.....	7
1.4. La rata Goto-Kakizaki como modelo experimental de diabetes mellitus	8
1.5. Glucemia y capacidad de reproducción de la rata Goto-Kakizaki.....	9
1.5.1. Glucemia y Estrés.....	10
1.5.2. Insulina	11
1.5.3. Bypass gástrico	11
1.6. Comportamiento maternal y ciclo estral en roedores.....	12
II.Antecedentes y Objetivos	14
2.1. Objetivos específicos	15
III. Material y Métodos	16
3.1. Instalaciones.....	16
3.2. Animales	16
3.2.1. Rata Goto-Kakizaki-UMH.....	16
3.2.2. Rata GK-UMH descendientes de padres sometidos a cirugía bariátrica	17
3.2.3. Rata Wistar	17
3.3. Reactivos	17
3.4. Procedimiento experimental	17
3.4.1. Toma de contacto	17
3.4.2. Periodo de cruce.....	19
3.4.3. Procedimiento experimenta	20
3.4.3.1. Administración de insulina.....	20
3.4.3.2. Control de peso y medida de glucemia	20
3.5. Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa oral.....	21

IV.Resultados	23
4.1. Reducción de los niveles de estrés mediante manipulación previa	23
4.2. Caracterización de la evolución del peso corporal en la colonia GK-UMH	24
4.3. Caracterización de la evolución de la glucemia en la colonia GK-UMH.....	27
4.4. Seguimiento de la capacidad de reproducción	29
4.5. Efecto del bypass quirúrgico	29
V.Discusión	32
VI.Conclusiones y Proyección Futura	34
VII.Bibliografía	36



RESUMEN

Los modelos animales de experimentación constituyen una poderosa herramienta en la investigación de fenómenos biológicos, particularmente en ciencias de la salud. Una de las enfermedades que mayor preocupación genera en la actualidad es la diabetes, ya que afecta a un porcentaje elevado de la población y su progresión va en aumento. Este estudio tiene como objetivo el establecimiento y caracterización de una colonia de ratas de la cepa Goto-Kakizaki, un modelo experimental reconocido de diabetes tipo II, en el Animalario de la Universidad Miguel Hernández, para su posterior uso en proyectos de investigación tanto básicos como clínicos.

Esta cepa presenta múltiples dificultades para su reproducción y mantenimiento debido a su condición diabética. En este trabajo se ha estudiado algunas características fenotípicas relacionadas con la diabetes en la colonia Goto-Kakizaki-UMH para su cotejo con la cepa origen y se plantean posibles mejoras zootécnicas para conseguir una población estable de la cepa y una mejora de su capacidad reproductiva. Se ha realizado un seguimiento del peso, la glucemia y la capacidad de reproducción y su posible afectación por diferentes estrategias antidiabéticas.

PALABRAS CLAVE: biomodelo, zootecnia, diabetes tipo 2, rata Goto-Kakizaki, insulina.

ABSTRACT

Animal models are a powerful research tool to study biological processes, particularly in health sciences. Diabetes is currently rising major concern, due to its increasingly high prevalence in world population. This work focuses on the growth and characterization of a strain of the Goto-Kakizaki rat, a widespread experimental model for type 2 diabetes, to be raised in the Animal Facility Service of the Miguel Hernández University for its later use in basic and clinical research projects.

Because of its diabetic condition, this breed is challenging to grow and presents a low reproductive outcome. We have studied some phenotypic characteristics related to diabetes present in Goto-Kakizaki-UMH animals, to be contrasted with the original strain. Feasible zootechnical improvement strategies have been explored to achieve a stable population as well as enhancing the strain reproductive capability. A followup has been carried out on body weight, glycemia and reproductive capability, and on how are they affected by different antidiabetic approaches.

KEYWORDS: biomodel, zootechnics, type 2 diabetes, Goto-Kakizaki rat, insulin.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Modelos de experimentación animal en investigación

La observación y la experimentación en animales han constituido uno de los pasos fundamentales en biomedicina, para el desarrollo de pruebas diagnósticas y terapéuticas y en los controles de productos farmacológicos. Por otro lado, el uso de modelos animales ha facilitado un gran desarrollo en las últimas décadas de la industria biotecnológica, con innumerables aplicaciones, como la creación de organismos genéticamente modificados y la producción masiva de moléculas de interés. Su utilidad en otras áreas, aunque menos conocida, posee un gran potencial. Dos ejemplos, de entre muchos, son la mejora de tecnologías reproductivas para la cría y recuperación de especies de animales domésticos y silvestres, o los ensayos de inocuidad de productos de consumo, incluyendo el uso de modelos animales como biosensores de la contaminación ambiental (Holtcamp, 2012).

Los beneficios en bienestar, calidad de vida y avances tecnológicos avalan el desarrollo de modelos de experimentación animal, o biomodelos, por la diversidad y el interés de sus aplicaciones.

1.2. La Diabetes mellitus: una disfunción en la regulación de la glucemia

Un funcionamiento adecuado del organismo animal requiere un control eficiente de los niveles de glucosa en sangre (glucemia), que sea capaz de responder a las continuas fluctuaciones generadas por múltiples factores como la ingesta, la actividad muscular o el estado metabólico del animal. La hormona insulina tiene un papel preponderante en la homeostasis de la glucosa. Una disminución en la secreción de insulina, o una falta de sensibilidad a la misma, provoca un aumento de la concentración de glucosa en sangre o hiperglucemia, lo que constituye la principal manifestación clínica de la diabetes.

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que, cuando no está controlada, es decir, cuando la hiperglucemia se mantiene en el tiempo, tiene efectos tóxicos sobre muchos tejidos corporales, lo que lleva al desarrollo de complicaciones en diversos órganos como los ojos (retinopatías), el riñón (nefropatías) o el sistema nervioso (neuropatías), que disminuyen mucho la calidad de vida, pudiendo resultar incluso letales.

En las últimas décadas, la incidencia de diabetes ha ido en aumento, llegando a convertirse en una de las grandes pandemias de nuestro tiempo: la OMS considera la diabetes como uno de los principales problemas actuales de salud pública a escala mundial (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016). Según esta organización, en el año 2014, 422 millones de personas en el mundo padecían diabetes, lo que supone el 8.5% de la población mundial adulta. También fue la causa directa de muerte en 1,5 millones de personas

a nivel mundial. Por otro lado, las complicaciones secundarias asociadas que conlleva causaron 2,2 millones de fallecimientos más.

El problema, lejos de mejorar, ha ido empeorando a pesar de las medidas implementadas: el incremento de la prevalencia de la enfermedad se ha disparado, duplicando en la actualidad el porcentaje de la población afectada, de un 8,5%, respecto al existente en 1980. El incremento se acelera de año en año y las estadísticas actuales superan las estimaciones de población afectada calculadas para 2030 [Wild *et al.*, 2004].

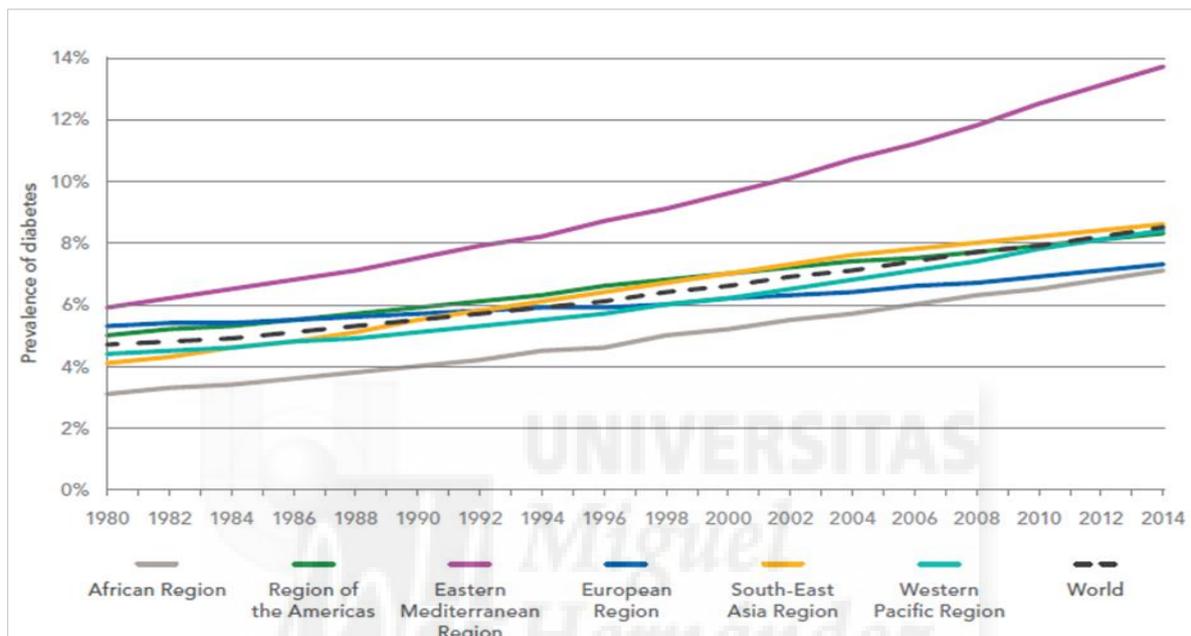


Figura 1. Prevalencia de la diabetes en el periodo 1980-2014 por región.
Tomada de: Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016

El aumento en los casos de diabetes se corresponde con un aumento de sus factores de riesgo, tales como el sobrepeso y la obesidad. En ese sentido, actualmente se considera que la mayor parte de los casos de diabetes tipo 2 (ver más abajo en este mismo apartado) resultan de la interacción entre los genes y el ambiente, considerando como ambiente, en un sentido amplio, a todos aquellos factores que no tienen naturaleza genética. De este modo, los factores ambientales nocivos favorecen la predisposición genética a padecer diabetes y otras enfermedades metabólicas relacionadas. Aparte de los más conocidos, como el sedentarismo y la ingesta calórica excesiva (Kahn *et al.*, 2006), en la última década se ha demostrado, además, una estrecha correlación entre la diabetes tipo 2 y la exposición a contaminantes ambientales (Shankar *et al.*, 2011). Es interesante comentar al respecto que la diabetes tipo 2 ha sido reconocida en muchos mamíferos, incluyendo animales de compañía, de campo y los mantenidos en cautiverio. Para otras especies, existen pocos datos al respecto (Klimentidis *et al.*, 2011). Sin embargo, cada vez hay mayor acuerdo en que algunas sustancias presentes en el ambiente a escala global, como diversos contaminantes

(plásticos, plaguicidas, derivados industriales etc.), pueden favorecer la aparición de este síndrome metabólico, lo que hace pensar que muchas especies podrían estar viéndose afectadas en este sentido, aun viviendo en un entorno natural y alejado de zonas industrializadas (Bard, 1999).

Según su etiología, se distinguen 3 tipos principales de diabetes mellitus:

- DM tipo1 (DM1): es debida a la destrucción autoinmunitaria de la célula beta productora de insulina. Lleva progresivamente al déficit absoluto de insulina y no puede prevenirse en la actualidad. No se conocen con exactitud las causas de la diabetes de tipo1, aunque la creencia general es que obedece a una interacción compleja entre los genes y factores ambientales. La mayoría de los casos de diabetes de tipo 1 se producen en niños y adolescentes.

- DM tipo 2 (DM2): su aparición está determinada por la interacción entre factores genéticos y metabólicos. El riesgo de padecerla se eleva con la presencia de edad avanzada, sobrepeso y obesidad, alimentación malsana, falta de actividad física y contaminantes ambientales. Es debida a un déficit progresivo de la secreción de insulina, o a una falta de respuesta a la insulina circulante (ver apartado siguiente). En este caso, existen enfoques eficaces para prevenir las complicaciones. Es, con diferencia, el tipo más abundante de diabetes y en el que nos centraremos en el presente trabajo.

- Diabetes gestacional (DG): es la diabetes diagnosticada durante el embarazo. Cursa con hiperglucemia moderada y, aunque desaparece con el parto, aumenta el riesgo futuro de obesidad y diabetes de tipo 2 tanto en la gestante como en la descendencia.

1.3. Modelos experimentales de diabetes con hiperglucemia moderada

Los modelos animales utilizados en las investigaciones sobre la DM2 facilitan el estudio de los mecanismos patogénicos que conducen a la presentación de esta enfermedad. También dan la oportunidad de explorar cómo los factores de riesgo favorecen la aparición de la enfermedad y, no menos importante, de encontrar formas de prevención para en salud pública.

Los biomodelos reconocidos de la DM2 pueden originarse espontáneamente por la expresión en los animales de diversas alteraciones genéticas. Alternativamente, también pueden ser inducidos de forma experimental en el laboratorio, sometiendo a los animales a factores de riesgo o condiciones que predispongan a la generación de la enfermedad. Por último, en algunos modelos se combinan ambas causas.

Las características comunes y que los define como animal modelo son, fundamentalmente, una concentración moderadamente elevada de glucosa en sangre y la resistencia a la insulina. Esta última se refiere al hecho de que la presencia de la hormona insulina, encargada de facilitar la entrada de glucosa a las células, no promueve una

normalización de la glucemia. Esto es debido a que los receptores celulares de la insulina se desensibilizan, de manera que, aunque el nivel de insulina circulante en sangre sea normal o incluso algo elevado, la glucemia se mantiene alta, proceso que se conoce como resistencia a la insulina. El organismo trata entonces de compensar esta disfunción secretando más insulina, por lo que es frecuente que la DM2 curse con hiperinsulinemia además de con hiperglucemia.

Dentro de los modelos de DM2 reconocidos, hay fundamentalmente dos grupos: aquellos que cursan con obesidad y aquellos en que la alteración del estado metabólico no causa un exceso de peso. El modelo empleado en este trabajo corresponde al segundo grupo.

1.4. La rata Goto-Kakizaki como modelo experimental de diabetes mellitus

La rata Goto-Kakizaki es una cepa no obesa derivada de la rata albina Wistar que desarrolla hiperglucemia en estadios tempranos. Este modelo fue desarrollado en los años 70 por Yoshi Goto, y Masaei Kakizaki, asociados, en la Tohoku University en Sendai, Japón, mediante la selección de parejas reproductoras de una colonia de ratas Wistar con los niveles más altos de glucosa en sangre (Goto *et al.*, 1975). Esta cepa se obtuvo de cruzar endogámicamente ratas Wistar puras, las cuales fueron manipuladas genéticamente para que desarrollaran intolerancia a la glucosa y criadas aleatoriamente en una colonia cerrada. La cepa está gestada a partir de padres con una glucemia basal en el límite alto de la normalidad, por lo que las crías tienen tendencia a tener niveles altos también.



Figura 2. Ejemplar de rata Goto-Kakizaki.

La selección repetida de reproductores resultó, después de al menos cinco generaciones, en descendencia con severa o moderada hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y otras alteraciones metabólicas relacionadas, como la resistencia a la insulina (Arias-Díaz y Balibrea, 2007; Ostenson, 2007).

La GK es una cepa no dependiente de insulina (hay producción de la hormona, aunque deficitaria) y presenta trastornos metabólicos, hormonales y vasculares similares a la enfermedad de la diabetes humana. Las características comunes con la DM2 humana incluyen hiperglucemia en ayunas, secreción alterada de insulina en respuesta a glucosa tanto in vivo como en células pancreáticas aisladas, resistencia insulínica y poliuria, (exceso de orina). También sufren complicaciones tardías como retinopatías, microangiopatías, neuropatías y nefropatías. Los fenotipos, y en particular la glucosa en sangre, son dependientes de la dieta, por lo que requieren un adecuado control de la misma.

La evolución de la DM2 en las ratas GK sigue también un patrón temporal con algunas similitudes al de la enfermedad en humanos, aunque no idéntico. Tras el nacimiento, presenta un período de normoglucemia que abarca principalmente la etapa de destete y que se relaciona con los eventos de pre-diabetes. Los machos desarrollan DM2 aproximadamente a las 14-16 semanas de edad, aunque la hiperglucemia moderada se observa desde las 8 semanas. Hasta pasados 12 meses de vida las ratas GK presentan hiperglucemia moderada en ayunas de forma estable (Portha *et al.*, 2012). La glucemia en ayunas está sólo ligeramente elevada por encima de los valores normales, pero aumenta considerablemente tras la ingesta de glucosa (Arias-Díaz y Balibrea., 2007). Alcanzan la madurez sexual aproximadamente entre 8-10 semanas de edad, en hembras; y un poco más tarde los machos, entre 10-12 semanas de edad. La duración de la gestación es de entre 21-23 días, y el tamaño medio de las camadas es de 5- 6 crías; éstas se destetan alrededor de los 28 días de edad.

Cuando la hembra GK gestante expone a su feto a niveles altos de glucosa en el útero, este microentorno provoca desarrollo anormal de las primeras células beta, secretoras de insulina en el esbozo pancreático. Además, una característica que ha puesto en evidencia la rata GK, de interés en el presente trabajo, es que la pérdida de capacidad regenerativa de las células beta es transmitida de una generación a otra (Akash *et al.*, 2013).

1.5. Glucemia y capacidad de reproducción de la rata GK.

En el Servicio de Experimentación Animal de la UMH, que suministra especímenes para proyectos de investigación dentro y fuera de nuestra universidad, se ha desarrollado una cepa GK, mantenida en el centro, denominada GK-UMH.

Para obtener una colonia estable y una producción previsible de animales en un servicio de experimentación animal resulta necesario tener buenos índices de reproducción. La glucemia elevada es un factor reconocido en muchas especies como causa de infertilidad

(Mounzih *et al.*, 1997). La cepa GK, como se ha explicado anteriormente, se obtuvo mediante cruces dirigidos de rata Wistar con altos índices espontáneos de glucemia basal, transmitiéndose de generación en generación dicha característica. Sin embargo, desde el punto de vista zootécnico, la cepa obtenida no es tan prolífica como la Wistar y presenta múltiples dificultades de reproducción: posee un bajo índice de gestaciones efectivas, y bajo índice de animales obtenidos por camada, que han descendido desde los 12 animales de la cepa originaria, hasta los 5-6 de la cepa GK. Por ello, se han ensayado diversas maniobras que permitan mejorar la producción de estos animales sin alterar su condición diabética que se describen a continuación.

1.5.1. Glucemia y Estrés

En el presente trabajo, era fundamental que los niveles medidos de glucemia reflejaran el estado metabólico del animal. Dado que las mediciones de glucosa pueden verse alteradas de manera importante por los niveles de cortisol (Rosmond, 2005), la hormona que se secreta en situaciones de estrés, se decidió realizar una etapa de habituación al manejo en los animales a utilizar en nuestro proyecto para reducir su estrés en la medida de lo posible. Por ello, se sometió a los animales a una habituación al contacto humano y a la manipulación, antes de comenzar las mediciones y la administración de insulina.

Aunque en nuestro país no hay mucha tendencia a emplear este tipo de maniobras para mejorar el bienestar animal, sí que es más común en otros países, como Estados Unidos, donde se aplican más asiduamente, con buenos resultados, sobre todo en especímenes producidos para investigación. Está demostrado que un menor estrés en los animales redundará en una mayor reproducibilidad y una menor variabilidad de los datos experimentales obtenidos (Turner, 2003).

Además de la toma en consideración del nivel de estrés, se pretende explorar aquí dos estrategias que pudieran contribuir a la disminución de la glucemia en los progenitores y con ello, mejorar la fertilidad: a) administración de insulina; b) bypass gástrico o eliminación de parte del tracto intestinal.

Puesto que el objetivo que se persigue es el establecimiento de una cepa como modelo animal, es necesario comprobar que estas estrategias no modifican en la descendencia la misma condición glucémica elevada de los progenitores, a fin de mantener las características genotípicas y fenotípicas de la cepa GK origen.

1.5.2. Insulina

La insulina es la hormona encargada de facilitar la entrada de glucosa a las células desde la sangre, por lo que la elección para la reducción de la glucemia puede parecer incuestionable. Sin embargo, el mantenimiento de la homeostasis de la glucemia es un proceso multifactorial, complejo, en el que intervienen muchos agentes, entre ellos, los niveles circulantes de otras hormonas, como el glucagón o la leptina.

En el desarrollo de la DM2, se pueden distinguir varias etapas, en las que la etiología va cambiando. En un principio, se desarrolla hiperglucemia por una secreción insuficiente de insulina por parte de las células beta del páncreas endocrino. En esta situación, el organismo trata de compensar este déficit de insulina estimulando más a las células productoras, con lo que aumenta su secreción. En esta primera etapa de la enfermedad, por lo tanto, la administración externa de insulina puede ayudar a normalizar la glucemia. Pero este efecto compensatorio genera, a su vez, que, con el tiempo, los receptores de insulina comiencen a desensibilizarse, por lo que cada vez es necesaria más insulina para controlar la glucemia, con lo que aparece el segundo efecto más característico de la DM2: la hiperinsulinemia (Pratley, 2000). En este periodo, la aportación de insulina externa es poco efectiva, porque el defecto está en el mecanismo de señalización en respuesta a la insulina, no en una deficiencia de la hormona. Por ello, en función del periodo del desarrollo de la enfermedad en el que se encuentre el animal, la administración de insulina externa puede ser poco efectiva.

Es necesario, a la hora de establecer un modelo de DM2, caracterizar con precisión la evolución de las distintas fases de la enfermedad en cada modelo.

1.5.3. Bypass gástrico.

En las dos últimas décadas, la cirugía bariátrica se ha empleado con éxito en el tratamiento de la obesidad severa acompañada de diabetes tipo 2 e hipertensión (Dixon *et al.*, 2012).

El efecto antidiabético de la cirugía no se encuentra ligado a los resultados de la pérdida de peso inducida quirúrgicamente y de la disminución de la ingesta calórica. Se ha llegado a la conclusión de que el control glucémico se produce inmediatamente, antes de cualquier pérdida significativa de peso, lo que sugiere que el control glucémico puede ser un efecto directo de la cirugía.

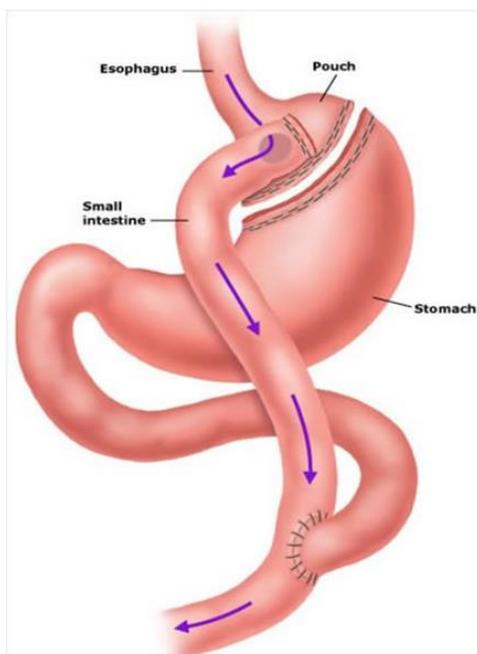


Figura 3: Apariencia del estómago tras un bypass gástrico. Tomada de: Federación Argentina de Cardiología

De hecho, los últimos años, esta técnica quirúrgica se está aplicando también al tratamiento de pacientes de DM2 no obesos con bastante éxito.

El bypass gástrico, de forma resumida, reduce parcialmente el estómago y lo une directamente al yeyuno, de manera que se abrevia el tránsito intestinal. Esto causa restricción alimentaria y saciedad precoz. Adicionalmente, el cuerpo absorbe menos calorías al evitar los alimentos parte del estómago y el duodeno.

En las ratas GK, se ha detectado que esta maniobra mejora el estado diabético rápidamente, incluso sin reducción en la ingesta de alimentos o pérdida de peso y mostró que el control de la DM2 inducida por bypass no dependía de la reducción de peso (Abad Alonso *et al.*, 2015). Se observó una mejora del control glucémico, con una disminución significativa en los niveles de glucosa e insulina después de una sobrecarga oral de glucosa (Zubiaga *et al.*, 2016).

Esta mejora en la condición diabética podría permitir un aumento en la fertilidad sin afectar a las características genotípicas y fenotípicas de la descendencia.

1.6. Comportamiento maternal y ciclo estral en roedores.

Con el fin de poder comprender los efectos relacionados con la capacidad de reproducción en la sección de Resultados, se describen aquí brevemente algunos rasgos del comportamiento maternal y de ciclo estral o reproductivo en la rata.

Además del efecto sobre la glucemia que produce el estrés, está descrito que también puede provocar una falta de cuidado maternal de las crías ocasionalmente, e incluso que la madre devore a la camada recién nacida (Burn *et al.*, 2006).

En este comportamiento juega un papel importante la eliminación de señales olfativas, fundamentales para que se dé el cuidado materno de éstas. En ratones, está descrito que la limpieza frecuente de las cajas incrementa la mortalidad de las crías y que incluso el levantamiento periódico de las tapas de las jaulas provoca una fuerte tendencia hacia un resultado reproductivo más pobre (Burn *et al.*, 2006).

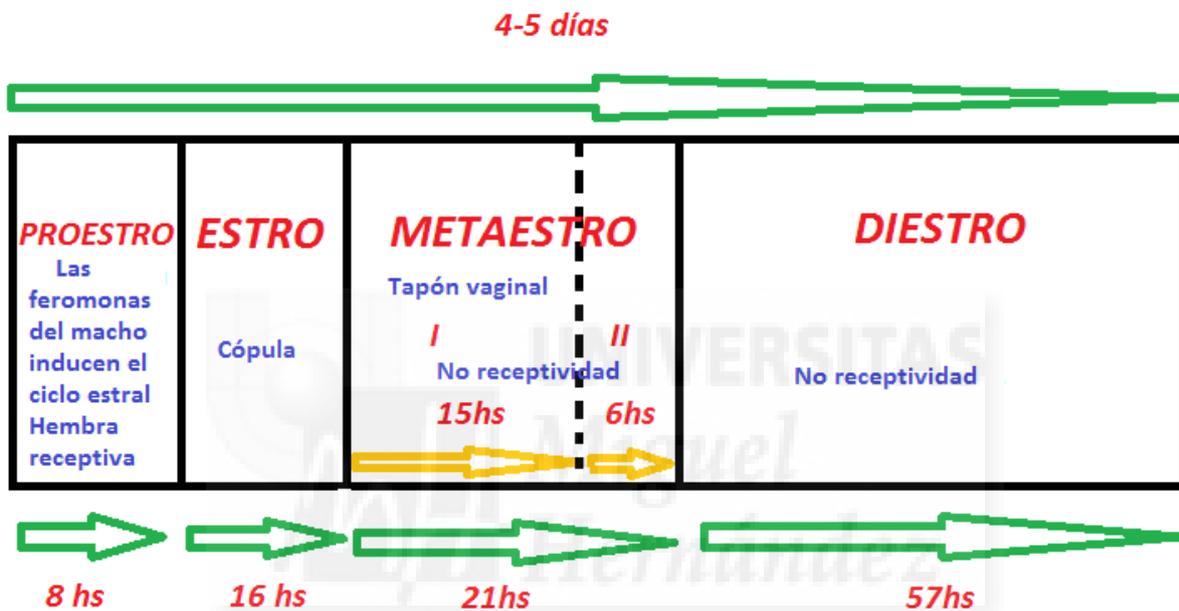


Figura 4: Ciclo estral de la rata común *Rattus norvegicus*.

La figura 4 muestra las fases del ciclo estral en la rata y su duración. Las ratas tienen un ciclo estral de 4 días normalmente. La ovulación en las hembras es inducida: con las feromonas del macho, el ciclo se resetea y comienza desde el día uno, con la hembra receptiva. Esta primera etapa es el PROESTRO, con una duración de 8 horas. En la etapa siguiente, la fase ESTRO, se produce la cópula. Si hay fecundación, se forma el tapón vaginal y el semen queda en la vulva, lo que produce que la hembra no pueda copular con otros machos. Tras 16 horas, comienza el METAESTRO: el tapón vaginal se solidifica, signo de que la hembra está embarazada, y a partir de aquí la hembra ya no está receptiva. La última fase, la más larga, es el DIESTRO, que dura alrededor de 57h.

II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los roedores como organismos modelo ofrecen muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos: son mamíferos, tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los servicios de experimentación, lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones.

El Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández aloja una cepa de rata albina, la rata Goto-Kakizaki (GK), un modelo de animal de experimentación muy valorado en estudios relacionados con diabetes tipo 2, que ya ha sido empleada en varios proyectos de investigación desarrollados tanto dentro como fuera de nuestra universidad. Su utilidad como modelo experimental de diabetes, y también de cirugía bariátrica, está ampliamente demostrada en la bibliografía.

Este biomodelo posee unas características metabólicas particulares: son hiperglucémicas e insulinoresistentes. Estas características son, por un lado, su mayor interés; por el otro, desde el punto de vista zootécnico, constituyen la mayor dificultad en cuanto a la disponibilidad y mantenimiento de individuos para su uso en investigación, ya que generan múltiples dificultades para su reproducción: bajo índice de gestaciones efectivas y bajo índice de animales obtenidos por camada, que han descendido desde los 12 crías por camada de media la cepa Wistar originaria, hasta las 5-6 obtenidas como promedio en la cepa GK. Esta baja capacidad de reproducción limita su uso como modelo animal y constituye el principal factor limitante a la hora de elegirlo para desarrollar una línea de investigación, a pesar de su idoneidad. Estas circunstancias, necesariamente, condicionan el desarrollo y planteamiento de este TFG.

Las cuestiones planteadas a lo largo del trabajo son de utilidad para avanzar en la caracterización de la cepa Goto-Kakizaki del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández, al que llamaremos GK-UMH, necesaria para conseguir una población estable y autorregenerable de estos animales en nuestras instalaciones.

Con estos antecedentes, podemos definir el **objetivo general de este trabajo**: la caracterización y mejora zootécnica de un modelo de experimentación animal en las instalaciones de Bioterio de la Universidad Miguel Hernández, para su posterior empleo en investigación.

2.1 Objetivos específicos:

- a) Detección y valoración de parámetros de estabulación que mejoren la supervivencia y reproducción de la cepa Goto-Kakizaki
- b) Conseguir una habituación al manejo en los animales para la evitar que el posible estrés generado durante la manipulación influya en los parámetros a registrar.
- c) Caracterizar la evolución del peso corporal en nuestra colonia y el posible efecto de la insulina sobre esta evolución.
- d) Caracterizar la evolución de la glucemia en nuestra colonia y el posible efecto de la insulina sobre esta evolución.
- e) Seguimiento de la capacidad de reproducción y factores susceptibles de mejorarla.
- f) Efecto del bypass quirúrgico sobre la condición glucémica de las ratas.
- g) Comprobar si la condición diabetógena característica del modelo se mantiene en la descendencia tras una intervención de cirugía bariátrica en progenitores.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Instalaciones

El presente trabajo se ha llevado a cabo íntegramente en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) del Campus de Sant Joan de la Universidad Miguel Hernández. El SEA está en un edificio aislado y adaptado para el mantenimiento, cuidado y producción de diferentes especies de animales de laboratorio. Las dependencias de animales se encuentran en diferentes estados de esterilización; hay que acceder con pijama o bata esterilizados, la cabeza cubierta con un gorro, la boca y la nariz, protegidas con mascarilla, calzas en los pies y guantes en las manos, todo ello de material desechable o reciclable.

Las condiciones ambientales fueron las siguientes; temperatura de $21\pm 3^{\circ}$ C (modulable en cada sala o box en función de cada animal), una humedad del $55\pm 15\%$, y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Para la realización de cualquier tipo de estudio con animales, es preciso contar con el permiso de estamentos autorizados. En este caso, el uso de los animales está aprobado tanto por el Órgano Evaluador de Proyectos de la UMH como por la Generalitat Valenciana con el código 2017/VSC/PEA/00075 de Tipo 2.

3.2. Animales

3.2.1. Rata Goto-Kakizaki-UMH

El SEA aportó 12 ratas GK-UMH, 6 hembras y 6 machos, con los que se formaron 6 parejas reproductoras.

Fecha de Nacimientos	Hembras	Machos
31/10/2016	3	3
14/11/2016	2	2
06/11/2016	1	1
22/11/2016	2	5

Tabla 1: Fechas de nacimiento de los animales, y número de individuos disponibles, distribuidos por sexo.

Las ratas nacieron en este centro, descendientes de la cepa originaria de TACONIC. Estos animales no habían sido utilizados en ningún proyecto anterior, por lo que era el primer contacto continuo que tenían con humanos, a excepción del manejo necesario para su higiene

y alimentación. Los animales pertenecían a diferentes camadas, por lo que existía una pequeña variabilidad en la edad de los individuos (tabla 1). Dado que las diferencias eran de dos semanas como máximo y que se emplearían en estado adulto, no era de esperar que esta variabilidad influyera en los resultados.

Los animales siguieron una dieta estándar, con acceso libre a de comida y agua, con adición esporádica de frutos secos. Únicamente en la prueba de tolerancia a la glucosa se mantuvo a los animales en ayuno.

3.2.2 Ratas GK-UMH descendientes de padres sometidos a cirugía bariátrica

Se dispuso también de 5 machos y dos hembras pertenecientes a la cepa en estudio, de tres meses de edad. Estos animales presentaban la particularidad de ser hijos de individuos empleados en un proyecto anterior, y que habían sido sometidos a cirugía bariátrica, por lo que su microentorno durante el desarrollo fetal había sido diferente (ver apartado 1.5.3 de la introducción). Se emplearon para realizarles una curva de tolerancia a la glucosa oral.

3.2.3. Ratas Wistar

Estos animales son la especie a partir de la que se obtuvo originalmente el modelo Goto-Kakizaki. Se emplearon puntualmente a modo de control negativo en las pruebas de evolución del peso y de la carga oral de glucosa.

3.3. Reactivos

- La insulina humana administrada era de la marca Lilly S.A, del tipo Humulina Regular, una solución inyectable de 100 UI/ml.
- La glucosa es de uso veterinario era de la marca BRAUN, de 500 ml, diluida 40g/ 100ml.
- Para realizar las diluciones, como en el caso de la glucosa, se utilizó suero fisiológico, de marca BRAUN solución inyectable, de uso veterinario, en envases de 10 ml, con una concentración de 9 mg/ml

3.4. Procedimiento experimental

A continuación, se explica con detalle el protocolo seguido en cada una de las fases del proyecto.

3.4.1 Toma de contacto

Este periodo consiste en un periodo de adaptación entre el humano y la rata. Para llevar a cabo esta etapa se realizan las siguientes actividades:

El primer día se realizó el marcaje, el cual consistió en marcar la cola con rayas distintivas, para poder identificar a los diferentes individuos

Antes de llevar las jaulas al pre-quirófano, éste se preparaba: en la bancada se colocaba papel de base, se preparaba la báscula y se taraba con el cepo (dispositivo donde mantener el animal durante el procedimiento), se preparaban semillas de girasol sin tostar y las tablas para apuntar los datos.

De lunes a viernes, se extraían las 6 jaulas del box y se colocaban en un carro para llevarlas al pre-quirófano, donde se realizaba la actividad diaria. Uno a uno, se iban sacando los animales de la jaula, y se pesaban. A continuación, se le colocaba debajo del utensilio de pesada (cepo). Para que se adaptara a él, y lo asociara con algo positivo, se recompensaba este paso con las semillas de girasol y con caricias en la cola, la cual siempre tenía que permanecer fuera de cepo, ya que sería necesario más adelante tenerla al alcance para tomar la muestra de sangre donde medir la glucemia.

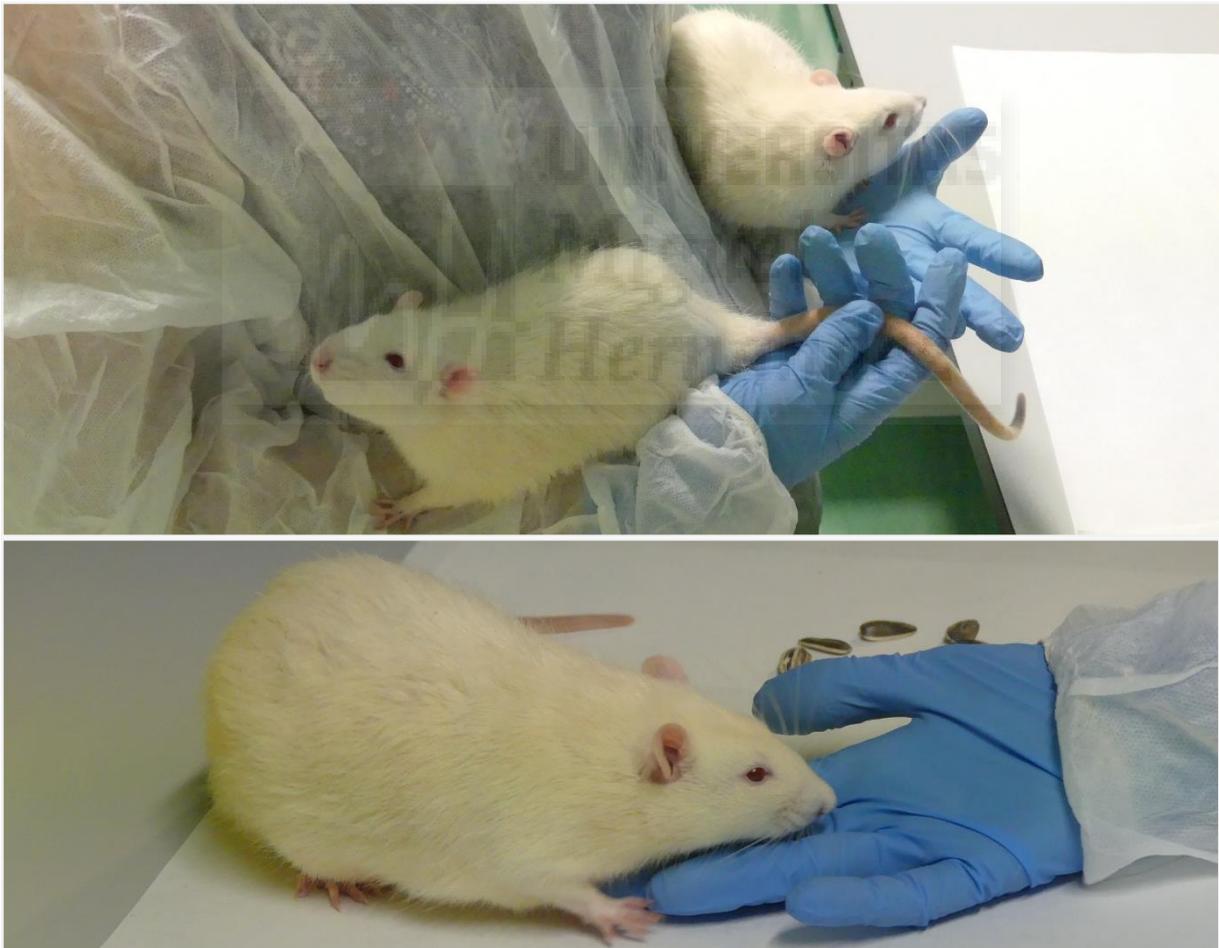


Figura 5: Manipulación de las ratas GK-UMH durante el periodo de toma de contacto.

Siempre se realizaba esta actividad con los animales en el mismo orden; se cogían las jaulas de los machos primero, se pesaban y se recompensaban, dedicándoles unos minutos a cada uno, para crear un vínculo humano-rata. Al finalizar con las 3 jaulas de los machos, se continuaba con las hembras, no sin antes cambiar el papel de base y los guantes. En caso contrario, la hembra centraría su atención en el olor que deja el macho y eso la altera, lo que implica que asociaría ese momento con excitación y no con relajación y confianza en el cuidador. Todo el proceso de pesado y de recompensa se repitió con las hembras.

3.4.2 Periodo de cruce

El segundo periodo consistió en formar las parejas de ratas para su reproducción. La selección de individuos para el cruce fue al azar, manteniendo entre ellos la condición de hermanos, es decir, nacidos el mismo día y de la misma madre. El procedimiento para formar esta nueva situación consistía en coger cubetas nuevas y limpias e introducir primero al macho solo en la cubeta, para que este marque y deje su olor en su nuevo territorio. Este proceso se repitió con todos los machos, y al cabo de unos 10 minutos aproximadamente, se introduce a una hembra en cada cubeta.

Una vez formadas las 6 parejas de ratas GK-UMH, se determina cuáles van a ser grupo control y cuáles las tratadas con insulina. También se asignó un nombre a cada animal. Este nombramiento, aparte de permitir identificar más fácilmente a cada animal a lo largo del proyecto, es un procedimiento que se emplea comúnmente por generar una relación diferenciada con cada individuo y permitir conocer las particularidades físicas y comportamentales de cada uno, favoreciendo que el animal se encuentre en una situación sin estrés y lo más tranquilo posible en cada acercamiento al humano.

Se administró diariamente 0.5 UI/Kg/día de insulina a 3 de las parejas, mientras que las otras 3 quedaron como grupo control. El segundo periodo, en total, abarcó 26 días.

	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO	DOMINGO
INSULINA	X	X	X	X	X	X	X
GLUCEMIA	X			X			
PESO	X	X	X	X	X		

Tabla 2: Cronograma del procedimiento experimental

Los términos de la tabla 2 hacen referencia a:

- INSULINA: Se refiere a la administración de la dosis adecuada para estas ratas en función de su tamaño y peso.
- GLUCEMIA: Se refiere al proceso de extracción de sangre para la medición de la glucemia basal
- PESO Proceso por el cual medimos el peso de la rata en la balanza tarada adecuadamente.

3.4.3 Procedimiento experimental

En el segundo periodo, un día completo en el laboratorio, como observamos en la tabla 2, se realizan las siguientes tareas:

3.4.3.1 Administración de la insulina

La administración de la insulina se realizó todos los días siempre a la misma hora, las 12:00 del mediodía. El proceso consistió en adaptar el pre-quirófano: en la bancada colocamos papel de base, preparar las tablas y las pipas, y a continuación, se llevaban al pre-quirófano las jaulas con las parejas de ratas. Se administraba a cada un 0.001 ml de la solución de insulina con una jeringuilla de 0.5ml, diluida con suero fisiológico. La administración de la insulina era subcutánea y se le pinchaba en el lomo.

Esta actividad se realizó siempre con los animales en el mismo orden. Para recompensarlas se les daban unas pipas, y se volvían a colocar en el BOX con el resto de jaulas.

3.4.3.2 Control de peso y medida de glucemia

La glucemia se midió con muestra de sangre de la cola; se realizó siempre a las 16:00 h, junto con la toma del peso. En primer lugar, se adaptó el pre-quirófano; en la bancada se colocó papel de base, se preparó y taró la báscula con el cepo. El siguiente paso fue preparar las pipas, las tablas para apuntar los datos, y se realizó la preparación del glucómetro (Contour® XT, Bayer) portátil, las respectivas tiras reactivas y gasas empapadas en alcohol para presionar y evitar infección del pinchazo de la cola.

Los niveles de glucosa en sangre de cada animal fueron determinados en muestras capilares obtenidas de la cola de los animales. Se realizó un pinchazo en la punta de la cola de cada rata para obtener una gota de sangre que luego se procesó a través del glucómetro. Se cogieron las jaulas en orden, y en cada pareja, se pesó el macho primero. A continuación, se colocaban bajo el cepo, se les realizaba el pequeño corte, y se analizaba la gota de sangre en el glucómetro. Se presiona la cola con la gasa empapada en alcohol sobre el pequeño

corte y se recompensaba. Se repitió el proceso con la hembra. Se continúa con las siguientes parejas, repitiendo el proceso en las 6 jaulas.



Figura 6: Una hembra GK-UMH, en el cepo sobre la báscula

Una vez analizadas las 6 jaulas, se devolvían al BOX y se daba por acabada la intervención.

3.5. Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa oral

Se calcularon las dosis de glucosa a administrar a cada individuo. La glucosa se administra de forma oral, a través de una sonda rígida metálica, diseñada para ratas. Previamente a este procedimiento, las ratas se mantuvieron en ayuno durante 8 horas. En primer lugar, se midieron las glucemias basales, identificadas en el estudio como Glucemia Basal en Ayunas (GBA) y posteriormente se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa. Para la Sobrecarga Oral de Glucosa (SOG) se administró una solución de glucosado a través de una sonda oral. Las muestras de sangre se tomaron a los 10, 30, 60, y 120 min de la administración de la glucosa.

Número	Sexo	Peso (gramos)	Glucosa (gramos)
I	H	261	0,522
II	H	264	0,528
SIN	M	410	0,82
I	M	416	0,832
II	M	398	0,796
III	M	420	0,84

Tabla 3: Valores de glucosa a administrar para la curva de tolerancia a la glucemia oral.

La proporción de glucosa se mide con respecto al peso de cada individuo, de manera que se administró 2 gramos de glucosa por cada kilo de peso de la rata. A partir de esta ecuación, se calculó la glucosa a administrar, según se recoge en la tabla 3.

Los niveles de glucosa en sangre de cada animal fueron determinados en muestras capilares obtenidas de la cola de los animales. Se realizó un mínimo corte o pinchazo en la punta de la cola de cada rata para obtener una gota de sangre, que luego se procesó a través de un glucómetro portátil y sus respectivas tiras reactivas (Contour® XT, Bayer).

IV. RESULTADOS

4.1 Reducción de los niveles de estrés mediante manipulación previa

El cortisol es una hormona que está directamente relacionada con el nivel de estrés que sufre un animal (Rosmond,2005). Uno de sus efectos a corto plazo es la movilización de glucosa desde los depósitos de glucógeno en el hígado, que permitiría al individuo responder de forma más efectiva a una hipotética situación de riesgo, mediante lucha o huida.

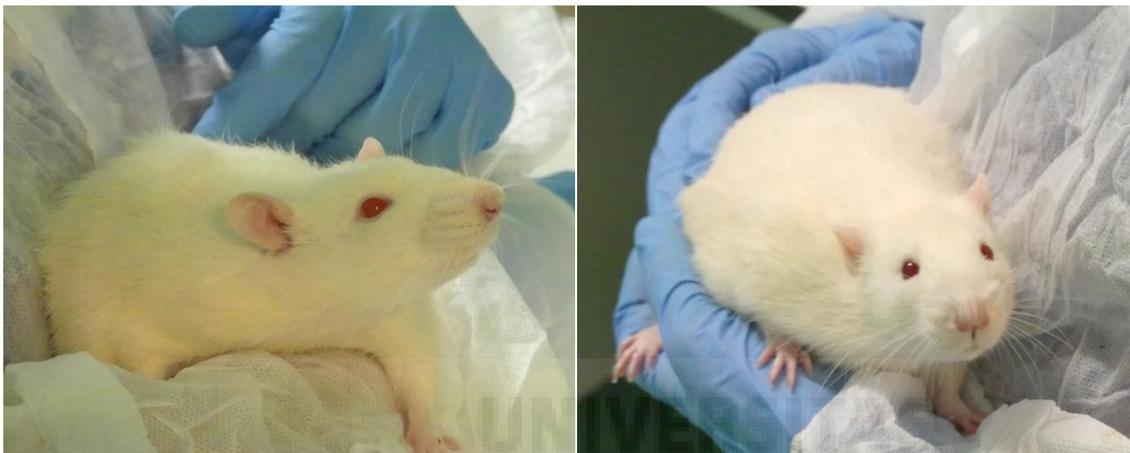


Figura 7: Detalle de la gestualización de la rata GK-UMH durante la manipulación.

En animales de laboratorio se emplean técnicas de habituación paulatina a la manipulación. Por último, el estrés puede afectar también a la fertilidad, otro aspecto a considerar en nuestro proyecto.

Para evitar que el estrés derivado de la manipulación de los animales por parte del experimentador afecte a los resultados de las medidas de glucemia, se decidió realizar una etapa de habituación a los animales a utilizar por parte del personal experimentador. De esta manera, se pretendía evitar que una secreción en la liberación de cortisol debida a la manipulación de los animales interfiriera en los niveles de glucemia, así como en el peso o en la consecución y el mantenimiento de la preñez, condiciones todas ellas muy sensibles al estrés en los animales.

La apreciación del nivel de estrés fue no invasiva, de carácter cualitativo y basada en el perfil gestual de cada individuo. Estuvo supervisada por el personal del SEA, con larga experiencia en el manejo de roedores y altamente entrenado en la observación de los cambios de gestualidad en estos animales.

El proceso seguido para conseguir la habituación, llevado a cabo durante cuatro semanas, se detalla en el apartado 3.4.1 de Material y Métodos.

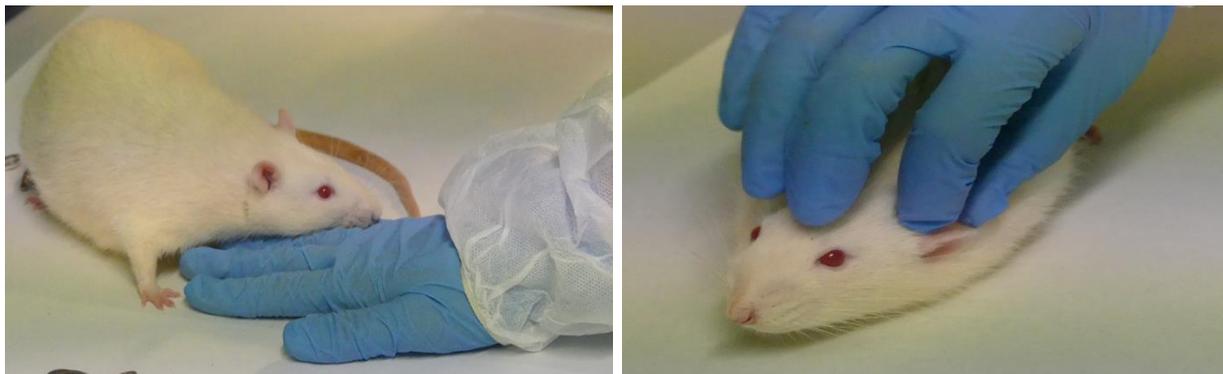


Figura 8: Adaptación de la rata GK-UMH al personal experimentador.

Tras el período de habituación a la manipulación rutinaria, los animales se mostraban dóciles, sin síntomas de nerviosismo y confiados frente al experimentador y presentaban una actitud colaboradora a la hora de tomar las muestras y los datos de pesaje correspondientes. No mostraron agresividad, ni intención de huida al cogerlos. Ni siquiera se alteraban al colocarlos en el dispositivo para realizarles la toma de muestras. El hecho de no buscar escondite y la posición de las orejas hacia atrás, mostraban, así mismo, que el animal estaba tranquilo y no estresado.

Tan sólo hubo un individuo que no pareció acostumbrarse a la presencia del experimentador y mostraba cierto nerviosismo cada vez que entraba en contacto con el personal investigador para cualquier prueba.

De estas observaciones, se concluye que el proceso de habituación resultó positivo y que las variaciones intra o interexperimentales observadas en las glucemias o el peso es poco probable que estén influidas por una condición de estrés en los animales utilizados.

4.2. Caracterización de la evolución del peso corporal en la colonia GK-UMH

En la rata albina, el peso corporal aumenta con la edad a lo largo de toda su vida. Desde el nacimiento hasta el destete aumenta de manera más rápida. Un par de semanas después de la pubertad, que tiene lugar sobre las 8-10 semanas, el aumento de peso se empieza a ralentizar, si bien sigue presente durante prácticamente toda la vida del animal. En la figura 9 se muestra la evolución del peso en ratas GK de la cepa original, obtenida de Taconic desde el momento del destete hasta las 16 semanas. El crecimiento en los machos es más o menos constante y no disminuye al alcanzar la edad adulta. A diferencia de los que ocurre en los machos, en las hembras hay un punto de inflexión definido alrededor de las 8-10 semanas. El aumento del peso se hace más lento coincidiendo con el momento en que se alcanza la madurez sexual.

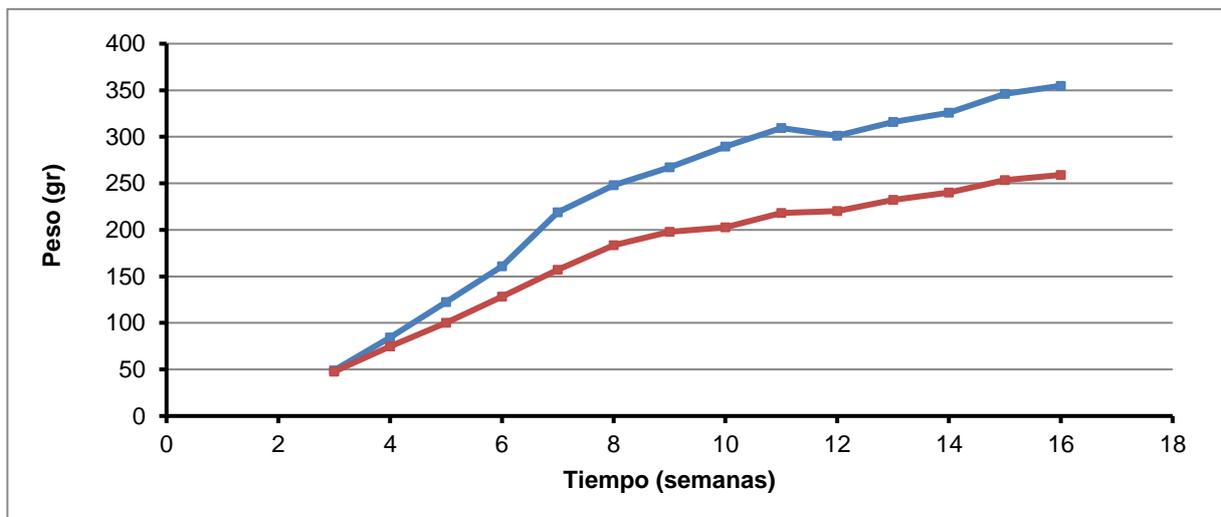


Figura 9: Evolución del peso de individuos macho (azul) y hembra (rojo) a lo largo de los primeros cuatro meses de vida

La colonia GK-UMH mantiene el patrón de crecimiento de la cepa origen. Se hizo un seguimiento del peso de los animales tratados y no tratados con insulina, a lo largo de un mes, cinco veces por semana, de lunes a viernes. En nuestro caso, durante la recolección de datos de peso, los animales tenían una edad aproximada de 4 meses, con dos semanas de diferencia máxima. Por lo tanto, ambos sexos se pueden considerar adultos plenamente desarrollados. Al igual que en el caso de la cepa original, a lo largo del período de medición, se observa un aumento leve, pero constante, del peso.

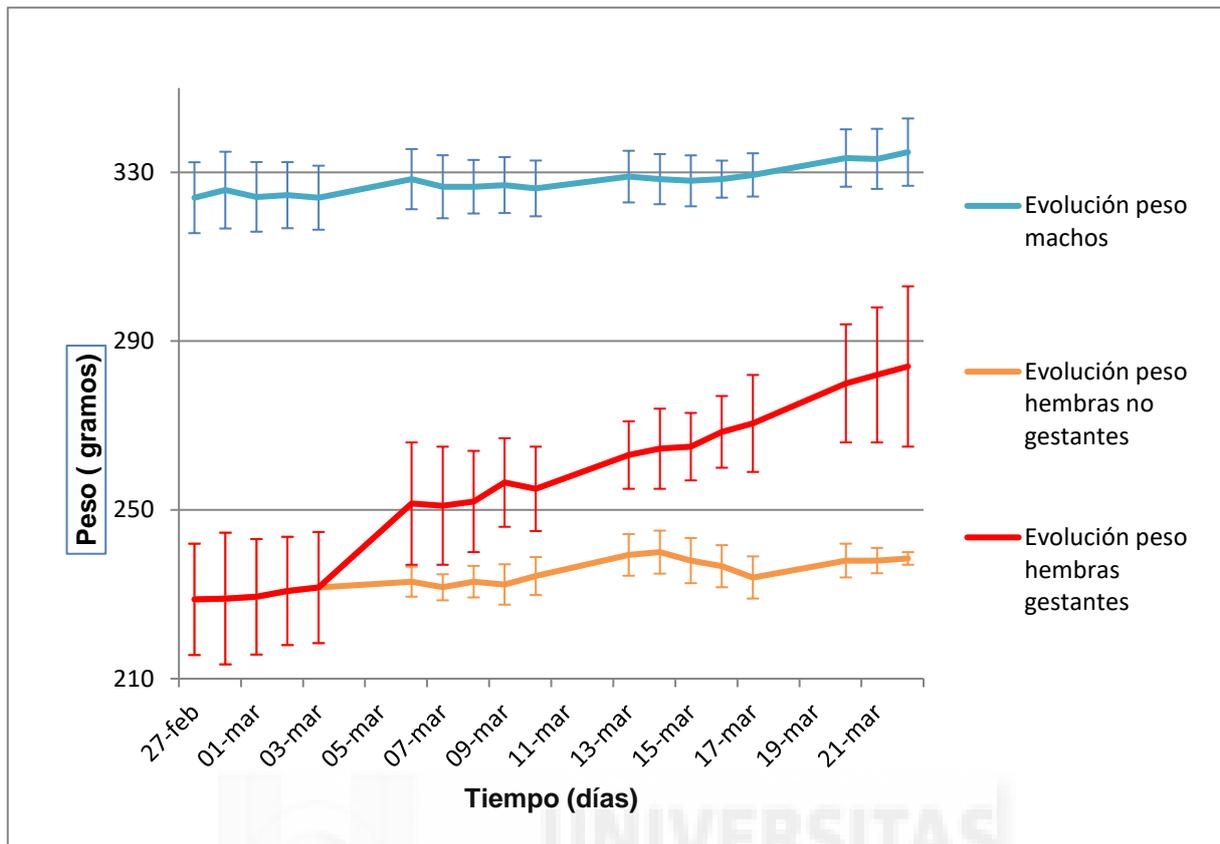


Figura 10: Evolución del peso de las GK-UMH con el tiempo: Machos, Hembras y Hembras Gestantes.

En la figura 10 se muestra la evolución del peso distribuida por sexos. Se muestran los datos como media +/- DE. El n es 5 machos, 3 para hembras no gestantes, y 2 para hembras gestantes. De la gráfica se extraen los siguientes datos:

- Machos: El peso de los machos tiene un aumento constante, con crecimiento siempre positivo.
- Hembras: la evolución del peso fluctúa algo más, con periodos en que el crecimiento se hace negativo. La velocidad de aumento de peso es porcentualmente la misma que en machos.
- Gestantes: hasta el día 8 de gestación, no hay diferencias con las no gestantes. A partir de ese día, hay un aumento significativamente más rápido del peso que se mantiene hasta llegar a término la gestación.

La evolución del peso como control de estado de gestación. En el caso de las hembras gestantes, hay un incremento en el aumento de peso que se hace siempre patente a entre los días 8-10, aproximadamente. Este dato es interesante porque en esta cepa GK-UMH el estado de gestación de las hembras puestas a reproducir no es fácil de observar. Los procedimientos habituales para conseguir ratas gestantes son: identificar la fase del ciclo

mediante frotis vaginal y formación del tapón vaginal tras la fecundación. Ninguno de estos procedimientos es fiable en la cepa GK, de manera que frecuentemente el estado de gestación pasa desapercibido hasta que sea posible palpar los fetos en el abdomen de la madre, con la gestación ya avanzada. Este cambio neto y consistente, con una ventana temporal de 48h en la evolución del peso ha sido el mejor indicativo para conocer el estado de gestación de las hembras GK de manera no invasiva. Este resultado resulta particularmente útil en una especie con dificultades para su reproducción como la nuestra, a la hora de poner en marcha una colonia de población estable.

Relación entre crecimiento y estrés. Un aspecto que nos resultaba de interés era conocer la posible influencia de las sesiones de habituación a la manipulación sobre la evolución del peso de los animales. Entre los efectos conocidos del estrés en los animales está la pérdida de peso. La habituación a la manipulación como supresor del estrés, podría suponer, por tanto, evitar que el aumento del peso estuviera condicionado por la propia toma de la medida. En relación con esto, se observó que, pesar de que el efecto de la habituación al manejo de los animales fue positivo, se ve una tendencia a mayores incrementos de peso durante el fin de semana, en el que no había manipulación, que entre semana. El mayor aumento de peso los días en que no hay habituación se mantiene constante a lo largo de todo curso temporal del proyecto, desde el inicio hasta el final. Desconocemos la causa de estos cambios de ritmo, pero es posible que factores relacionados con los cambios de rutina, o con la presencia de olores, ruidos o vibraciones, a los que las ratas son muy sensibles, puedan explicar estas observaciones.

4.3. Caracterización de la evolución de la glucemia en la colonia GK-UMH

La glucemia elevada es un factor reconocido como desfavorable para la fertilidad, tanto en machos como en hembras. El modelo GK presenta, como modelo de diabetes tipo 2 que es, una hiperglucemia moderada. Nos planteamos la normalización de la glucemia en las GK-UMH para ver si mejoraba la capacidad de reproducción de la cepa. Para ello se pensó mantener la glucemia en un rango óptimo mediante la aplicación de dosis subcutáneas de insulina. Se estudió el efecto de la insulina sobre la glucemia, sobre el número de camadas y sobre el número de animales obtenidos por camada.

Se administró insulina a los animales en cantidades ajustadas a su peso dos veces por semana y se midió la concentración de glucosa en sangre a lo largo de un periodo de 21 días. No se observan diferencias entre las glucemias de los dos grupos: los valores de la glucemia son en ambos casos moderadamente elevados y bastante dispersos, abarcando un rango amplio, entre 120 y 200mg/dl, en ambos grupos. Concluimos que la insulina, a estas

concentraciones y en estas condiciones, no es capaz de normalizar la glucemia ni de estabilizarla en nuestra cepa.

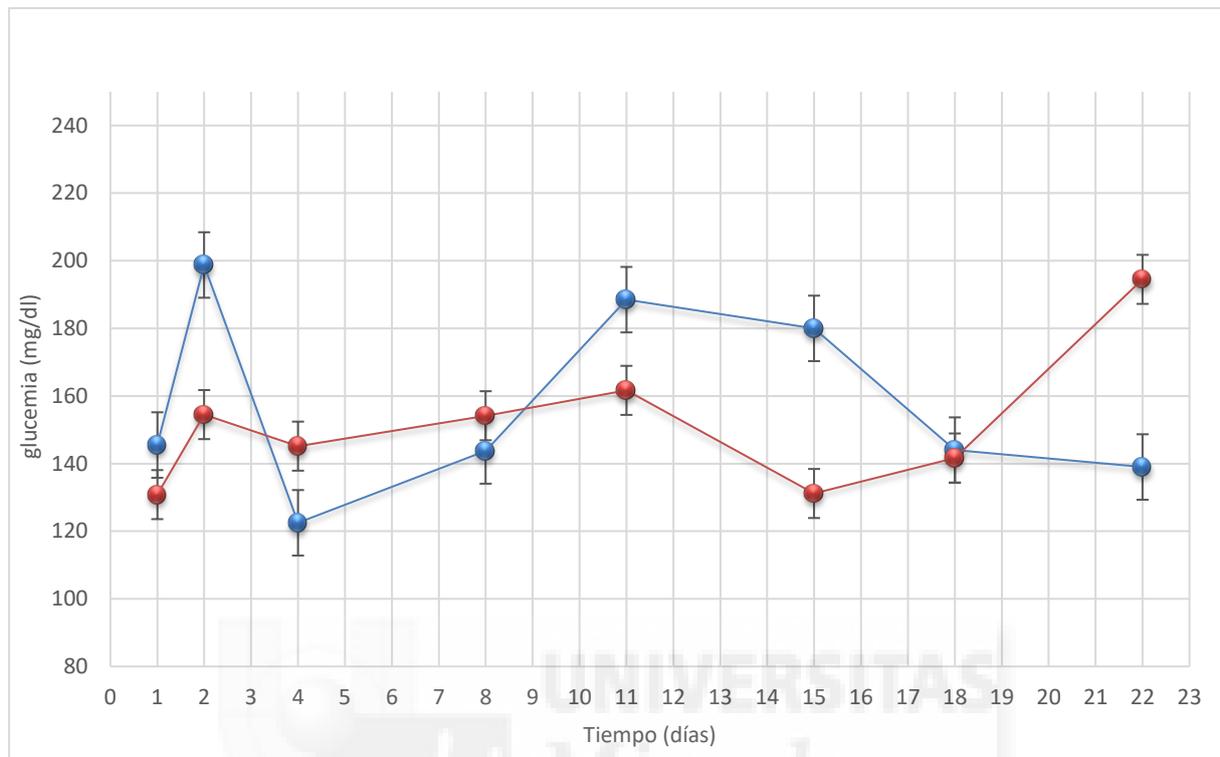


Figura 11: Valores promedio de la glucemia: tratadas con insulina en azul (n=4), no tratadas con insulina en rojo (n=6)

Se da la circunstancia de que una de las hembras del grupo de las tratadas con insulina murió a la semana de comenzar la administración de insulina. Esta hembra no mostraba signos de estar enferma y ganaba peso con normalidad. La necropsia no mostró ninguna causa de la muerte, por lo que se sospecha que, dada la variabilidad de los valores glucémicos y la baja capacidad de la insulina para mantener unos valores estables de glucemia, pudiera sufrir una hipoglucemia. Esto nos sugería que el tratamiento con insulina como herramienta para aumentar la capacidad de reproducción en base a normalizar la glucemia podía ser difícil de establecer y ajustar.

4.4. Seguimiento de la capacidad de reproducción

Relacionado con los datos obtenidos en el apartado anterior, hicimos un seguimiento del efecto de la insulina sobre la capacidad reproductora de las GK-UMH. La tabla siguiente resume los datos obtenidos al respecto:

	TRATAMIENTO	FERTILIDAD
PAREJA 1	Insulina	muerte de la hembra
PAREJA 2	Insulina	n=0
PAREJA 3	Insulina	n desconocida (depredadas, 1 ^a camada) 8 crías (2 ^a camada)
PAREJA 4	Control	5 crías (1 ^a camada) 6 crías (2 ^a camada)
PAREJA 5	Control	8 crías 07
PAREJA 6	Control	n=0

Tabla 4: Camadas y número de crías por camada de cada pareja de animales control o tratadas con insulina.

Los datos recogidos no muestran un aumento claro en la producción de animales con la administración de insulina. De la tabla 4, podemos concretar los resultados siguientes:

- En primer lugar, en los dos grupos, control y no tratado, hubo una pareja no fértil de un total tres.
- En segundo lugar, de nuevo en ambos grupos hubo una pareja con dos camadas nacidas.
- En tercer lugar, de las camadas a término, no se desprende una diferencia clara en el número de crías por camada entre los dos grupos, aunque el dato obtenido de n=8 para las tratadas con insulina es alentador en ese sentido, ya que es superior al promedio publicado de crías por camada en la cepa Goto-kakizaki, que está alrededor de 5.

De nuestros resultados, y siempre con carácter preliminar, podemos concluir que tras el tratamiento con insulina no se observa una mejora sustancial en la capacidad de reproducción, al menos a esta n.

4.5. Efecto del bypass quirúrgico

El bypass gástrico es una maniobra quirúrgica comúnmente empleada contra la obesidad, rasgo que suele acompañar a la diabetes de tipo 2.

El interés en nuestro caso se debe a que se ha demostrado que el bypass gástrico disminuye la hiperglucemia y mejora la condición diabética en un plazo muy corto tras la operación, antes incluso de que los efectos debidos a una menor ingesta tengan lugar. Resulta llamativo, por otro lado, que, según datos del SEA no publicados, parejas de rata GK-UMH sometidas a bypass tuvieron camadas inmediatamente después de la operación.

En el Servicio de Experimentación estaban disponibles algunos individuos de esas camadas. Nos planteamos explorar la condición diabética de esos descendientes, para conocer si se mantenían las características de los padres, es decir si se preservaba la condición diabetógena de los padres operados y el fenotipo diabético, a pesar de haberse gestado en un entorno normoglucémico. Para ello, se empleó en este caso el test de tolerancia a la glucosa oral. La prueba de sobrecarga oral de glucosa se utiliza ampliamente para el estudio de la tolerancia a la glucosa. Esta prueba proporciona mayor información que la obtenida en las medidas de glucosa basal, ya que informa también sobre la secreción de insulina y sus efectos. La tolerancia a la glucosa podemos definirla como la expresión de la eficacia con que los mecanismos homeostáticos restauran la glucemia a los valores basales tras una perturbación de la misma.

Se realizó una curva con ratas Wistar a modo de control para conocer las características de la curva en ratas normoglucémicas.

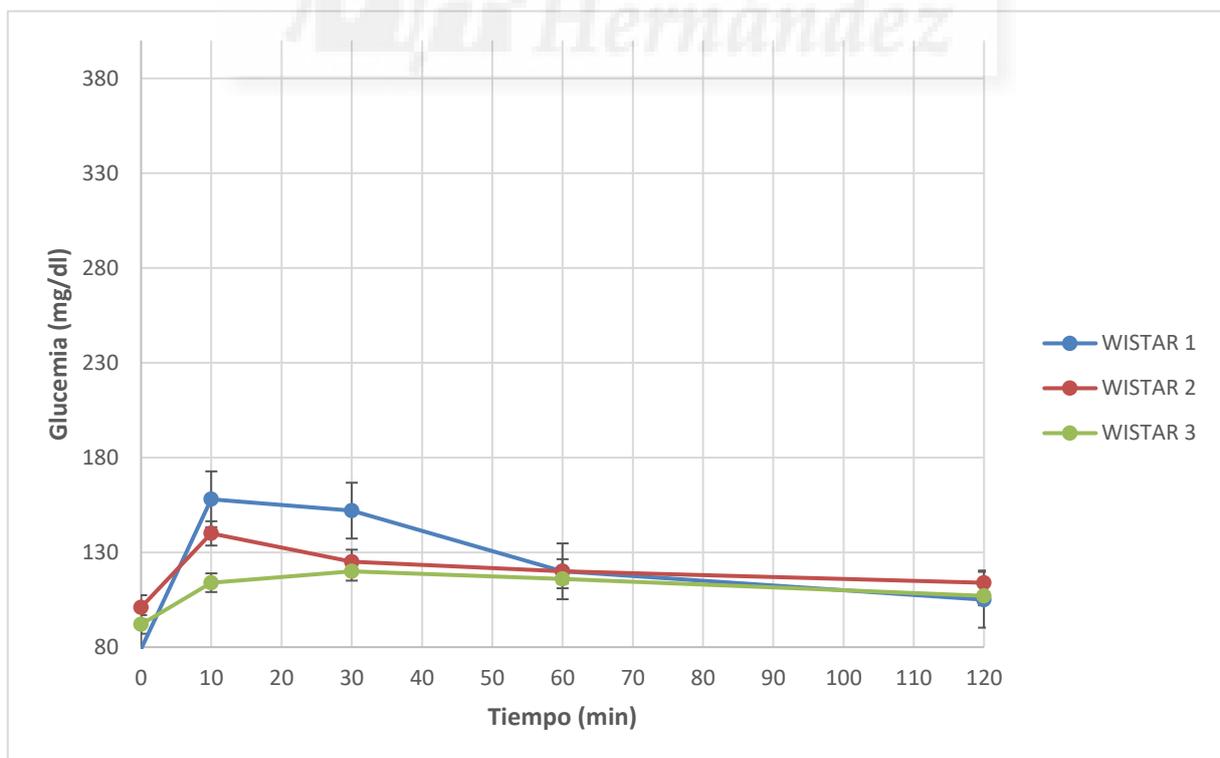


Figura 12: Curvas individuales de tolerancia a la glucosa oral en ratas Wistar.

En esta curva control se observa una glucemia basal dentro de los valores normales en todos los casos, por debajo de 110 mg/dl. También se observa que la máxima concentración de glucosa se alcanza rápidamente, entre los 10 y los 30 minutos. Por último, a las dos horas la glucosa se encuentra algo elevada, pero con tendencia a ir aproximándose a su valor basal.

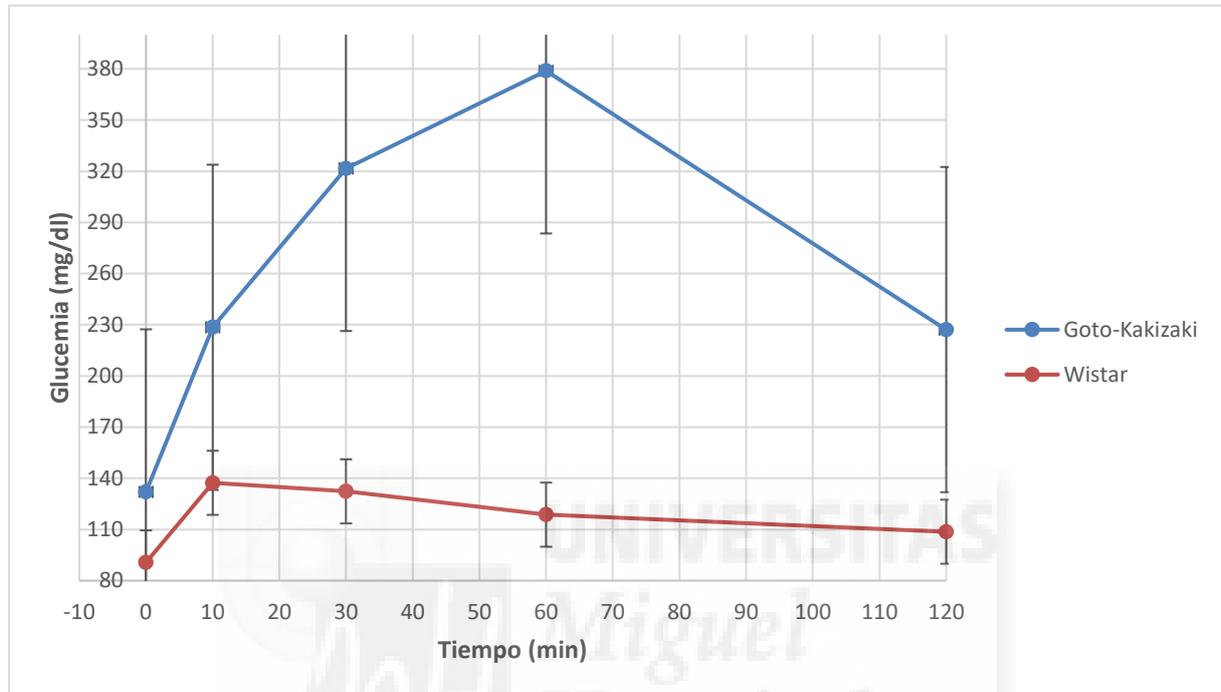


Figura 13: Curvas de tolerancia oral a la glucosa en ratas Wistar y GK-UMH.

En la figura 13, se representan los promedios de ambas curvas para su comparación. En el caso de las GK-UMH descendientes de operadas, la curva de tolerancia a la glucosa oral (Figura 13) presentó algunas diferencias respecto al control. En primer lugar, la glucemia basal es elevada respecto a las Wistar, aunque existe bastante dispersión. En segundo lugar, el tiempo en que se alcanzan valores máximos de glucemia se retrasa hasta los 60 minutos. Por último, a las dos horas, los valores de glucemia están prácticamente todos por encima de 200 mg/dl. Estos valores son indicativos de que la descendencia de los progenitores operados sigue siendo diabética.

V. DISCUSIÓN

La obtención de modelos de experimentación animal cualificados posee un gran interés para su aplicación en muy diversas áreas de investigación, desde la biomedicina y la biotecnología, a la producción de especies biosensoras de contaminación ambiental o la cría y recuperación de especies en peligro de extinción (Curry *et al.*, 2013).

El propósito de este trabajo es el establecimiento y desarrollo de un biomodelo diabético en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández: una cepa de la rata Goto-Kakizaki propia, llamada GK-UMH, para su distribución y uso por equipos de investigación.

Un biomodelo autorizado debe poseer dos condiciones fundamentales: a) estar biológicamente estandarizado, de manera que conserva de generación en generación los rasgos biológicos que la caracterizan y b) poder cubrir la posible demanda de manera estable mediante una suficiente capacidad de reproducción.

La glucemia es uno de los parámetros fundamentales que definen el estado diabético de un animal, por lo que es importante evitar cualquier factor que desvirtúe su medida. Uno de esos factores es el aumento del cortisol generado en situaciones de estrés (Rosmond, 2005). Por ello, se decidió inducir en los animales una habituación al contacto humano y a la manipulación antes de comenzar con la toma de datos para reducir su estrés en la medida de lo posible.

Aunque en nuestro país no hay mucha tendencia a emplear este tipo de maniobras para mejorar el bienestar animal, sí que es más común en otros países, como Estados Unidos, donde se aplican más asiduamente con buenos resultados, sobre todo en especímenes producidos para investigación. Está demostrado que un menor estrés en los animales redonda en una mayor reproducibilidad y una menor variabilidad de los datos experimentales obtenidos con esos animales (Turner, 2003). La evaluación cualitativa por parte del personal del Servicio de Experimentación nos indica, según sus observaciones, que el aspecto sano, comportamiento dócil y la actitud curiosa y colaboradora de los animales son concordantes con una ausencia de estrés por manipulación. El estrés también puede provocar una falta de cuidado maternal de las crías ocasionalmente, e incluso canibalismo materno (Burn *et al.*, 2006). En nuestro trabajo sólo ha ocurrido en un caso, que no consideramos achacable a estrés en la madre gestante, ya que el animal se mostraba tranquilo durante la manipulación a lo largo todo el periodo de toma de muestras. Estos resultados estarían en la estadística normal en la cría de roedores. Aunque no podemos conocer con certeza las causas en este caso, un motivo frecuente de eliminación de las crías es su baja viabilidad neonatal, más elevada de lo normal en gestaciones en un entorno hiperglucémico.

Se plantean dos estrategias para la disminución de la glucemia en los progenitores y mejorar los índices de reproducción: a) administración de insulina; b) bypass gástrico o

eliminación de parte del tracto intestinal. Otra aproximación que podría explorarse es la de introducir cambios en la dieta; se sabe, por ejemplo, que los ácidos grasos insaturados favorecen la fertilidad (Bashandy, 2007).

Los valores de glucemia obtenidos son superiores a los medidos en ratas Wistar, la cepa originaria no diabética. Estos valores se corresponden con la hiperglucemia moderada característica de la cepa Goto-Kakizaki. A pesar de esta hiperglucemia presente en nuestra cepa, la administración de insulina no tuvo efecto sobre la misma o sobre el peso de la cepa GK-UMH. Cabría pensar si la vía de administración o la dosis de insulina no fueron las adecuadas. Sin embargo, se siguieron las especificaciones marcadas por la casa comercial que suministra la cepa Goto-Kakizaki original, supuestamente las más ajustadas a nuestro modelo. No es infrecuente la dificultad en el ajuste de la dosificación de la insulina (Pinheiro *et al.*, 2011), ya que la glucemia está sujeta al control de otras hormonas además de la insulina. Una posible explicación para la ineffectividad de la insulina deriva del hecho de que, en el período en el que se ensayó, los animales hubieran desarrollado ya una resistencia a la misma por desensibilización de sus receptores. Así como la aparición y el desarrollo de la hiperglucemia está bien caracterizados, la evolución temporal de la inmunorresistencia y la edad a la que la cepa Goto-Kakizaki la adquiere, está menos definida.

A la vista de esta ausencia de efecto de la insulina, era de esperar que tampoco afectase a la fertilidad. La insulina, no sólo no aumentó la fertilidad, sino que, una vez terminado el período de administración de insulina, nacieron otras dos camadas.

Respecto al by-pass gástrico como maniobra ensayada para la mejora de la fertilidad en la cepa Goto-Kakizaki, en la que se elimina quirúrgicamente parte del tubo digestivo para disminuir la absorción de nutrientes, se había visto que tenía efectos positivos sobre la glucemia que no parecen depender de la pérdida de peso, ya que se observan inmediatamente tras la operación (Dixon *et al.*, 2012). Además, es posible que mejore la fertilidad también: de una de las hembras recién operadas nació una camada en un celo postparto, hecho nada frecuente en estos animales y menos en recuperación postquirúrgica. Para que esta estrategia hipoglucemiante resultara útil era necesario comprobar que los descendientes mantenían las características fenotípicas de la cepa. La curva de glucosa oral ensayada demuestra que así es: las ratas hijas (F1) de animales con by-pass gástrico, mantenían la hiperglucemia característica de la cepa, es decir que el proceso de bypass realizado a los progenitores no altera la fenotipia de la cepa. La curva de evolución de la glucosa muestra valores moderadamente hiperglucémicos característicos de las Goto-Kakizaki originarias. El peso en estos animales resultó ser algo mayor que en las hijas de ratas no operadas. De estos últimos datos existe muy poca información bibliográfica, pero podrían deberse a que el desarrollo fetal de las crías de hembras operadas se produjo en un entorno materno normoglucémico.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que:

1. La cepa de rata Goto-Kakizaki desarrollada en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández, denominada GK-UMH, constituye un biomodelo válido para su uso en proyectos de investigación relacionada con diabetes.
2. La evolución del peso de los animales GK-UMH con el crecimiento se corresponde con los modelos estándar de GK criados en centros de referencia.
3. Los niveles de glucosa medidos en sangre demuestran que la cepa GK-UMH mantiene la hiperglucemia moderada característica de la cepa original.
4. La administración de insulina a las ratas GK-UMH a los 4 meses de edad, que corresponde al estado adulto, no afecta sustancialmente al peso corporal ni a la condición hiperglucémica de los animales, lo que sugiere que, en ese estadio, ya está presente la segunda característica distintiva de la diabetes tipo 2: la insulinorresistencia.
5. No se observa una influencia significativa de la insulina sobre los índices de reproducción de la cepa GK-UMH, observación que resulta también consistente con la presencia de resistencia a la insulina.
6. La maniobra de reducción del tracto gastrointestinal conocida como bypass quirúrgico, empleada como tratamiento antiobesidad, que normaliza los niveles de glucemia, podría mejorar la capacidad de reproducción de la cepa sin alterar las características genotípicas y fenotípicas de los descendientes.

PROYECCIÓN FUTURA

Los resultados obtenidos suponen un mejor conocimiento del modelo animal GK-UMH en desarrollo y proporcionan nuevas alternativas para su optimización.

Sería interesante, en primer lugar, una buena caracterización de la aparición y desarrollo de la resistencia a la insulina. Un intervalo de tiempo entre el inicio de la madurez sexual y la aparición de la resistencia a la insulina permitiría emplear la insulina en ese plazo para normalizar la glucemia y, con ello, obtener una mayor capacidad de reproducción. Así mismo, la medición por técnicas de radioinmunoensayo de los niveles de insulina y cortisol aportarían información valiosa sobre el control endocrino de la glucemia en este modelo.

Otra vía a explorar, que surgió a lo largo del proyecto, es la inclusión en la dieta de ácidos grasos insaturados ya que, como hemos observado, parecen aumentar la capacidad reproductora de la rata GK-UMH. Existe evidencia en la literatura de que este aporte es efectivo en algunas especies de roedores (Bashandy, 2007). Además, su administración es muy sencilla, ya que las semillas de girasol, a las que son muy aficionados son estos animales, contienen abundantes ácidos grasos insaturados.

Es necesario recordar que una de las limitaciones del modelo y el origen de este proyecto es el escaso número de gestaciones y número de crías a término que se obtienen. En este sentido, y dados los buenos resultados de la técnica del by-pass quirúrgico para mejorar la capacidad reproductora, sería de interés la puesta a punto de una versión laparoscópica de la técnica, menos invasiva, para poder aplicarla a las GK-UMH de manera regular en el quirófano del Servicio de Experimentación Animal. Ello supondría un menor tiempo de recuperación de los animales, menos necesidad de espacio para postoperatorio y menos gasto en general. Además, aunque este biomodelo se diseñó en un principio para diabetes tipo 2, la implementación de esta nueva modalidad quirúrgica sería de gran interés para proyectos clínicos relacionados con la cirugía bariátrica.

Si esta estrategia resultara exitosa, sería imprescindible hacer un seguimiento de las glucemias en ayunas de los animales hijos de operados para completar los datos de las curvas de tolerancia a la carga oral de glucosa y demostrar que en esta descendencia la fenotipia de la cepa se mantiene intacta.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Akash MS, Rehman K, Chen S. Goto-Kakizaki rats: its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev.* 2013;9(5):387-96
- Arias-Díaz, J, Balibrea J. Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes *J. Nutr. Hosp.* 2007;22(2):1699-8
- Bard SM. Global Transport of Anthropogenic Contaminants and the Consequences for the Arctic Marine Ecosystem. *Marine Pollution Bulletin.* 1999; 38(5):356-379
- Bashandy AES. Effect of Fixed Oil of Nigella Sativa on Male Fertility in Normal and Hyperlipidemic Rats. *International Journal of Pharmacology,* 2007;3:27-33
- Burn CC, Peters A, Day MJ, Mason GJ. Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. *Lab anim.* 2006;40(4): 353-370
- Curry BE, Ralls K, Brownel Jr RL. Prospects for captive breeding of poorly known small cetacean species. *Endang Species Res* 2013;19(3):223-243
- Dixon JB, le Roux CW, Rubino F, Zimmet P. Bariatric surgery for type 2 diabetes. *The Lancet* 2012;379 (9833):60401-2
- Goto Y, Kakizaki M, Masaki, N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc. Jpn. Acad.* 1975; 51:80-5
- Holtcamp W. Glow Fish: A New Biosensor to Detect How Environmental Estrogens Affect Tissues. *Environ Health Perspect.* 2012; 120(7): a284.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006;444(7121):840-6
- Klimentidis YC, Beasley TM, Lin HY, Murati G, Glass GE, Guyton M, Newton W, Jorgensen M, Heymsfield SB, Kemnitz J, Fairbanks L, Allison DB, Canaries in the coal mine: a cross-species analysis of the plurality of obesity epidemics. *Proceedings of the Royal Society B.* 2011;278(1712):1626–1632
- Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology.*1997;138:1190–1193
- Ostenson, C.G. (2007) The Goto-Kakizaki Rat. *Animal Models of Diabetes. Frontiers in Research,* 2nd edition. Ed.: Eleazar Shafir. CRC Press, 119-37
- Pinheiro LS, Dutra de Melo A, Andreazzi AE, Caires Jr LC, Barros Costa M, González Garcia RM. Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 2011;38(2)
- Portha B, Giroix MH, Turrel-Cuzin C, Le-Stunff H, Movassat J. The GK Rat: A Prototype for the Study of Non-overweight Type 2 Diabetes. *Meth mol biol.* 2012; 933:125-59

- Pratley RE, Weyer C, Bogardus C. (2000) Metabolic abnormalities in the development of noninsulin-dependent diabetes mellitus. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. Diabetes mellitus, ed 2. Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers; 548–557
- Rosmond R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30(1):1-10
- Shankar A, Teppala S. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(12):3822-6
- Turner PV, Smiler KL, Hargaden M, Koch A. Refinements in the Care and Use of Animals in Toxicology Studies: Regulation, Validation, and Progress *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2003;42(6): 8-15
- WHO. Diabetes Global Report. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2016
- Zubiaga L, Abad R, Ruiz-Tovar J, Enriquez P, Vílchez JA, Calzada M, Pérez De Gracia JA, Deitel M. The Effects of One-Anastomosis Gastric Bypass on Glucose Metabolism in Goto-Kakizaki Rats. *Obes Surg*. 2016;26(11):2622–2628

PÁGINAS WEB CONSULTADAS

- Charles River; Animal Models of Disease; 2011, Charles River Laboratories International, Inc. www.criver.com
- Federación Argentina de Cardiología: <http://www.fac.org.ar/6cvc/llave/c331/brasesc00.php>
- Taconic Models for life. www.taconic.com