

# ANIMALES DE LABORATORIO

PRIMAVERA 2021 / NÚMERO 89



**Escasez de macacos para investigación:  
¿efecto inesperado de la pandemia?**

---

**Agrupación de ratones macho adolescentes como estrategia  
para no alojar ratones recién destetados solos**

---

**Entrevista a Hernán Serna y Juan M. Baamonde,  
organizadores de ExpoBioterios Virtual 2020**

## 3 EDITORIAL

## 9 NOTICIAS

- *In memoriam* Javier Sicilia Alonso.
- Publicación del Real Decreto 118/2021, de 23 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero.
- La SECAL participa en la elaboración de la Guía sobre el mantenimiento de la capacitación.
- La historia de Mussi, traducido al alemán.
- Propósito 5 km de la SECAL.

## 17 ACTUALIDAD

- La falta de monos de laboratorio retrasa meses muchas investigaciones clave.
- Los modelos animales de xenograft (PDX-PDOX) mantienen el comportamiento genético de los tumores humanos originales.
- La vacuna de la COVID-19 abre una nueva vía contra la esclerosis múltiple.

## 21 TÉCNICAS

- Modelos de diabetes inducida. ¿Cómo elegir el modelo correcto?

## 27 ÉTICA Y LEGISLACIÓN

- Escasez de macacos para investigación: ¿efecto inesperado de la pandemia?

## 29 ALCUIDADO

- Manipulación de cerdos y ovejas en el mundo de la investigación.

## 33 PANORAMA

- La gestión de la pandemia en un animalario, todo un desafío.

## 39 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

- Herramientas para el análisis de edición mediada por nucleasas.

## 47 BIENESTAR ANIMAL

- Agrupación de ratones macho adolescentes como estrategia para no alojar ratones recién destetados solos.

## 51 ABS LAB

- Filtración efectiva en Unidades de Tratamiento de Aire (UTAs) para la reducción de partículas posibles portadoras virales presentes en el aire de interiores.

## 57 ENTREVISTA

- Entrevista a Hernán Serna (Binaex) y Juan M. Baamonde (Bioterios.com), Organizadores de ExpoBioterios Virtual 2020.





## Modelos de diabetes inducida. ¿Cómo elegir el modelo correcto?

Joaquín Lilao-Garzón, Carmen Valverde-Tercedor, Silvia Muñoz-Descalzo, Ana M<sup>a</sup> Wägner y Yeray Brito-Casillas  
Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC)

**Palabras clave:** insulina, roedor, glucemia.

### INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de enfermedades que afectan al metabolismo de la glucosa. Se caracteriza por una falta de secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  pancreáticas, un efecto inadecuado de esta insulina en los tejidos conocido como resistencia a la insulina, o una combinación de ambas<sup>1</sup>.

La DM se considera una pandemia global con una prevalencia que alcanzó al 8,5% de la población en adultos mayores de 18 años en 2014, y que fue responsable de 1,6 millones de muertes en 2016 según la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo la séptima causa de muerte ese año<sup>2</sup>.

La clasificación de la Asociación Americana de Diabetes<sup>1</sup>, organismo de referencia en el campo, establece cuatro categorías principales:

- **DM tipo 1 (T1DM del inglés *Type 1 Diabetes Mellitus*)**, donde normalmente se produce una falta completa de la secreción de insulina debida a una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas.
- **DM tipo 2 (T2DM del inglés *Type 2 Diabetes Mellitus*)**, debida a una pérdida gradual de la secreción de insulina, causada por la resistencia de los tejidos a la misma.
- **DM gestacional (GDM del inglés *Gestational Diabetes Mellitus*)**, donde pese a no existir signos obvios de DM al inicio, esta se manifiesta mediante una hiperglucemia leve, normalmente durante el segundo o tercer trimestre del embarazo.
- **Grupo de tipos específicos de DM debidos a otras causas**, como por ejemplo síndromes monogénicos, enfermedades del páncreas exocrino o inducidos por drogas.

La Confederación de Sociedades Científicas de España considera vital el uso de animales de investigación para el avance de la medicina. Esto se hace especialmente importante en enfermedades sistémicas como la DM donde, a pesar de la existencia de herramientas de reemplazo, éstas siguen sin poder abarcar completamente la complejidad de esta enfermedad<sup>3</sup>.

### MODELOS ANIMALES

La DM puede darse de manera espontánea en gran número de especies, incluyendo los roedores, y algunos de estos modelos espontáneos, como el ratón NOD (*Non Obese Diabetic*) o la rata BB-DP (*Biobreeding-Diabetes Prone*) han resultado clave para el estudio del proceso autoinmune que caracteriza a la T1DM. Otros modelos espontáneos son aquellos donde la acción de la hormona reguladora del apetito leptina está afectada, como la rata ZDF (*Zucker Diabetic Fat*) o los ratones mutantes *ob/ob* y *db/db*, los cuales han resultado de gran utilidad en el estudio de la T2DM. Estos ratones *ob/ob* homocigotos carecen de la hormona leptina, mientras que tanto el modelo de ratón *db/db* como el de rata ZDF carecen de su receptor<sup>4</sup>.

Por otro lado, los modelos de DM inducida son los más usados por ser mucho más fáciles de generar que los espontáneos y por ser más precisos a la hora de representar el fenotipo de la enfermedad observado en pacientes. Estos modelos se clasifican en<sup>3</sup>:

- **Modelos inducidos quirúrgicamente**, donde todo o parte del páncreas es extirpado de forma quirúrgica. Estos fueron los primeros modelos en desarrollarse y los que menos se utilizan actualmente por la falta de especificidad entre páncreas endocrino y exocrino durante el disección, lo que lleva a la aparición de otros síntomas no relacionados con la DM.

- **Modelos inducidos genéticamente**, en estos modelos se lleva a cabo la edición genética de uno o más genes. Aunque son ideales para conocer la función concreta de un gen, se trata de modelos caros de generar y necesitan más tiempo para ser creados. Además, no reproducen completamente una enfermedad tan compleja como la DM, donde tanto la genética como el ambiente juegan un papel crucial.
- **Modelos inducidos químicamente**, donde la DM se desarrolla por la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas mediante compuestos químicos con afinidad, desencadenando una respuesta oxidativa letal para la célula. Se suelen emplear la estreptozotocina (STZ) o el aloxano. Estos modelos han sido ampliamente utilizados especialmente en el estudio de T1DM, por su bajo coste y la facilidad para inducir una sintomatología franca en poco tiempo.
- **Modelos inducidos por la dieta**, normalmente mediante dieta grasa (HFD). Son los más utilizados para el estudio de la T2DM, ya que permiten simular la resistencia a la insulina que se observa en la T2DM humana. Estos requieren más tiempo que los inducidos químicamente, ya que los animales son alimentados con la HFD durante algunas semanas para desarrollar la enfermedad. También pueden ser usados como inductores de la enfermedad algunos sacáridos como la

fructosa, o incluso colesterol, contribuyendo a dar complejidad al modelo.

La combinación de algunos de estos cuatro métodos permite a los investigadores el desarrollo de modelos más precisos a la hora de estudiar la enfermedad, como por ejemplo la combinación de HFD con STZ para acelerar el desarrollo de T2DM<sup>5</sup>.

## ELECCIÓN DEL MODELO

La elección de uno de estos modelos para estudiar la DM puede resultar complicada para quien quiere investigar esta enfermedad. De hecho, en la literatura encontramos multitud de métodos generados o adaptados por diferentes autores para generar modelos de diabetes. Sin embargo, la elección del modelo debe hacerse de manera cuidadosa, atendiendo específicamente al tipo de DM en estudio, además de a las ventajas e inconvenientes de cada uno de estos métodos (ver Tabla 1). Por ejemplo, un tratamiento corto con grandes dosis de STZ permite obtener una hiperglucemia severa debido a la destrucción de células  $\beta$ , un resultado que podría resultar ideal para el estudio de la T1DM, pero no de la T2DM. Por otro lado, el uso de HFD con el objetivo de inducir T1DM se desaconsejaría, ya que con este tipo de dietas solo se conseguiría una hiperglucemia entre leve y moderada, debida principalmente a la presencia de resistencia a la insulina (ver Figura 1).

**Tabla 1.-** Ventajas e inconvenientes de los modelos animales inducidos para el estudio de DM.

TIPOS DE MODELOS INDUCIDOS	QUIRÚRGICOS	GENÉTICOS	QUÍMICOS	DIETÉTICOS
<b>VENTAJAS</b>	<p>Uso en gran número de especies.</p> <p>Permite ajustar la severidad de la DM.</p> <p>Permite conseguir hiperglucemia moderada y severa.</p> <p>Rápido de generar.</p>	<p>Permite el estudio concreto de un gen en el desarrollo de la DM.</p>	<p>Uso en gran número de especies.</p> <p>Versátil para T1DM o T2DM dependiendo de la estrategia de administración.</p> <p>Método de bajo coste.</p> <p>Específico en cuanto a la pérdida de células <math>\beta</math>.</p> <p>Rápido de generar.</p>	<p>Uso en gran número de especies.</p> <p>Permite modelar la interacción entre la genética y el ambiente.</p> <p>Gran similitud con la etiología de la T2DM en humanos.</p>
<b>DESVENTAJAS</b>	<p>Muy invasivo.</p> <p>Requiere personal experimentado.</p> <p>Enfermedades colaterales debido a la pérdida de otras células endocrinas y del páncreas exocrino.</p> <p>Alta mortalidad.</p>	<p>Limitado número de especies. Aunque nuevas tecnologías han permitido su aumento.</p> <p>Pérdida de la heterogeneidad en la población.</p> <p>Posible mortalidad y enfermedades colaterales.</p> <p>Lento y caro de generar.</p>	<p>Falta de resistencia a la insulina en T2DM.</p> <p>Falta de proceso autoinmune en T1DM.</p> <p>Efectos reversibles en ciertos casos.</p> <p>Posible toxicidad en otros órganos.</p> <p>Respuesta variable incluso dentro de la misma especie.</p>	<p>Respuesta heterogénea.</p> <p>Solo hiperglucemia leve.</p> <p>Proceso moderadamente lento.</p>

TIPOS DE MODELOS INDUCIDOS	QUIRÚRGICOS	GENÉTICOS	QUÍMICOS	DIETÉTICOS
TIPO DE DM	T1DM, T2DM y GDM.	T1DM, T2DM, GDM y otros tipos de DM como monogénicas.	Principalmente T1DM, pero también T2DM y GDM.	Principalmente T2DM, pero también GDM.

DM: Diabetes Mellitus; T1DM: Diabetes Mellitus Tipo 1; T2DM: Diabetes Mellitus Tipo 2; GDM: Diabetes Mellitus Gestacional.

Adaptada de<sup>4</sup>.

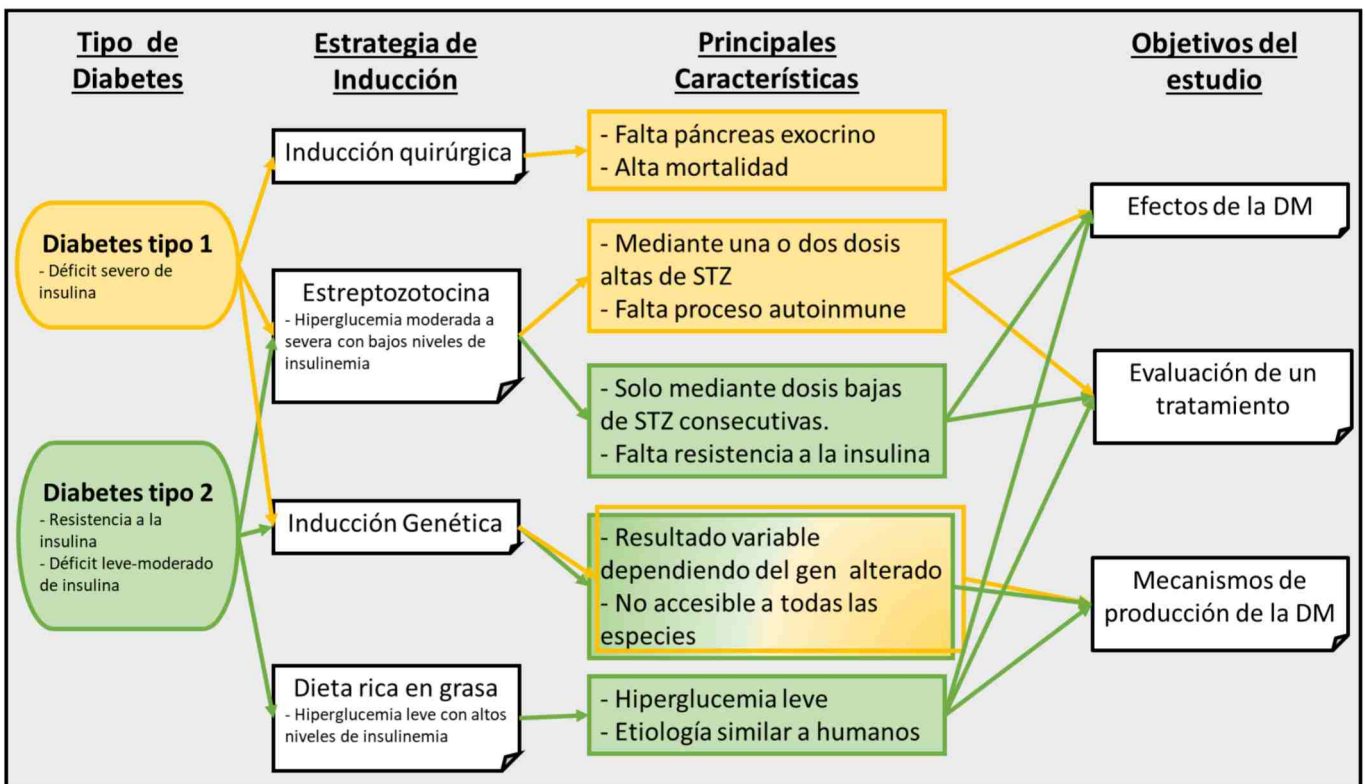


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-** Estrategia de inducción en función del tipo de DM y el objetivo del estudio. En este sentido, existe un gran número de publicaciones científicas en las que la selección del modelo de diabetes no suele detallarse, ni justificarse, tratándose a la DM como una enfermedad única, sin tener en cuenta importantes especificidades de cada tipo de DM.

Debido a estas ventajas e inconvenientes (ver Tabla 1) de cada modelo, la selección de uno de ellos es clave en función del tipo de DM en estudio y ha convertido a los modelos químicos, especialmente, el tratamiento con STZ, y aquellos basados en HFD en los dos modelos más utilizados en la actualidad. Estas dos estrategias, por lo general, son las más sencillas para generar un modelo de DM, pero su simplicidad junto con la falta de exactitud

en la evaluación de la glucosa ha llevado a la existencia de un extenso rango de condiciones y protocolos. La heterogeneidad en los protocolos queda patente en la bibliografía (ver Tablas 2 y 3). Aunque es bueno que cada laboratorio establezca empíricamente un modelo que se ajuste a sus necesidades, esto dificulta en gran medida la replicación de los resultados y la comparación de resultados obtenidos.



## MODELOS INDUCIDOS POR STZ

En este caso existen dos aproximaciones mayoritarias a la hora de desarrollar un modelo mediante el tratamiento con STZ (ver Tabla 2). Por un lado, una estrategia es utilizar hasta cinco administraciones de dosis bajas de STZ, en torno a 50 mg/kg de peso, en días consecutivos. Mediante este protocolo se observa una hiperglucemia entre leve y moderada similar a la que se puede observar en la T2DM, pero en este caso es causada por una

destrucción gradual de las células  $\beta$  pancreáticas como ocurre de forma espontánea en la T1DM, sin incluir la resistencia a la insulina.

Por otro lado, otra estrategia consiste en la inyección de una o dos dosis altas de STZ, entre 180 y 250 mg/kg de peso. Este protocolo permite una destrucción rápida y casi completa de las células  $\beta$  pancreáticas y es una de las estrategias más ampliamente utilizadas para el estudio de la T1DM.

**Tabla 2.** -Ejemplos de protocolos para la generación de modelos diabéticos con STZ.

DOSIS DE STZ (mg/kg)	NÚMERO DE INYECCIONES IP	CEPA DE RATÓN	TIPO DE DM INDUCIDA SEGÚN LOS AUTORES
50	1	ICR	DM inducida en neonatos
50	5	C57BL/6	T1DM
50	5	C57BL/6	Hiperglucemia definida por glucosa >300 mg/dl sin ayuno
50	5	C57BL/6	Definido como dosis subdiabetogénica de STZ
150	1	C57BL/6	Combinado con HFD para generar T2DM
180	1	C57BL/6	T1DM
60	1	C57BL/6	DM inducida en neonatos
35	5	ICR	T1DM causada por insulinitis gradual
240	1	Kunming	T1DM definida por glucosa >198 mg/dl con ayuno
100	2	C57BL/6, ICR	Definida como DM leve
100+80	1+1	C57BL/6	Combinado con HFD y modelo genético para generar T2DM
75	3	Kunming	DM definida por glucosa >288 mg/dl
190	1	C57BL/6	DM pregestacional definida por glucosa >240 mg/dl sin ayuno
230	1	CD1	DM pregestacional definida por glucosa >306 mg/dl sin ayuno
50	5	C57BL/6	T1DM pregestacional definida por glucosa >200 mg/dl sin ayuno
75	3		

STZ: Estreptozotocina; DM: Diabetes Mellitus; HFD: Dieta rica en grasa (del inglés *High Fat Diet*); IP: intraperitoneal; T1DM: Diabetes Mellitus Tipo 1; T2DM: Diabetes Mellitus Tipo 2.

Adaptada de<sup>3</sup>.

## MODELOS INDUCIDOS POR HFD

A la hora de inducir DM mediante cambios en la dieta también se han propuesto distintas aproximaciones. Para la más utilizada, se cambia la dieta normal (ND) por una dieta enriquecida con hasta un 80%<sup>6</sup> de grasa (HFD, del inglés *High Fat Diet*) durante 12 semanas<sup>7</sup>. Otras aproximaciones surgen de la combinación de HFD con fructosa (HFHF) por ejemplo<sup>8</sup>. En este caso se trata de generar un modelo de T2DM de modo similar a como ésta se

genera en humanos, especialmente cuando la T2DM está muy relacionada con las modernas dietas *Fast Food* ricas en grasas y bebidas azucaradas.

En este caso, también hay una gran heterogeneidad en los protocolos tanto en la edad de los animales al comienzo del cambio de dieta como en la duración del tratamiento o incluso el porcentaje de grasa de la misma (ver Tabla 3).

**Tabla 3.-** Ejemplos de protocolos utilizados en artículos recientes para la generación de modelos diabéticos basados en HFD.

CEPA DE RATÓN	EDAD RATÓN (sem)	TIEMPO DE DIETA (sem)	DIETA	TIPO DE DM INDUCIDA SEGÚN LOS AUTORES	AÑO PUBLICACIÓN	REFERENCIA
C57BL6/J	6	9	60% HFD	Resistencia a la insulina. Alteraciones metabólicas inducidas por dieta son dependientes del sexo.	2020	9
C57BL6/J	5	16 +6	40% HFD	Hiper glucemia sin signos de resistencia a la insulina.	2019	10
C57BL6/J	6	8	60% HFD	Hiper glucemia acompañada de resistencia a la insulina	2019	11
C57BL6/J	8	14	60% HFD	Resistencia a la insulina inducida tras 12 semanas de dieta.	2019	12
C57BL6/J	6	8 16	60% HFD	Pre-diabetes en 8 y en 16 semanas. Severidad aumenta con el tiempo de dieta.	2019	13
C57BL6/J	8	8	45% HFD	T2DM tras 8 semanas de dieta únicamente en machos y no en hembras.	2019	14
C57BL6/J	18	7	35% HFD	Hiper glucemia causada por la HFD.	2018	15
C57BL6/J	4	12	35.5% HFD	Hiper glucemia y sensibilidad a la insulina.	2017	16

## MODELOS DE DIABETES GESTACIONAL

En mayor o menor medida, todas las aproximaciones vistas hasta ahora son susceptibles de ser utilizadas para inducir diabetes gestacional<sup>3</sup>. Aunque el problema de la falta de homogeneidad en un protocolo concreto persiste, como ocurre en la inducción de DM mediante STZ y HFD. En este caso, una de las aproximaciones que mejor reproduciría la enfermedad sería mediante la combinación de ambas, realizando un cambio en la alimentación del animal a HFD que desarrolle la resistencia a la insulina para, a continuación, realizar un tratamiento a dosis bajas de STZ que acelere la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas antes de llevar a cabo el apareo, que ocasiona una hiper glucemia transitoria durante la gestación<sup>17</sup>.

## OTRAS CONSIDERACIONES

Un aspecto que destacar dentro de esta falta de estandarización respecto al modelo, y las diversas adaptaciones a la hora de generarlo, son las determinaciones de la glucemia en roedores. Éste es un problema muy relevante al que apenas se le presta atención<sup>18</sup>. El análisis de la glucemia de forma rápida y con poco volumen de sangre hace necesario el uso de glucómetros. Normalmente se emplean los destinados para humanos, porque son accesibles (en España se dan de forma gratuita), y miden de manera rápida y sencilla. Sin embargo, el criterio para elegir estos aparatos suele ser la propia accesibilidad al mismo y a sus tiras reactivas. No obstante, la falta de exactitud entre estos sistemas y la técnica de referencia para la determinación de la glucemia, puede ser importante<sup>19</sup>. A esta situación se suma el hecho de que en muchas ocasiones los autores no aportan ni si quiera el modelo de glucómetro usado en su trabajo, facilitando a veces tan sólo la casa comercial.

La falta de criterio en esta elección y en el reporte de datos posterior, afecta a la reproducibilidad de los resultados entre laboratorios. La importancia en estas diferencias es tal, que dos modelos de una misma casa comercial, en una medida puntual de glucemia, pueden ofrecer un valor normal de glucosa o uno diagnóstico de DM. Algo que ocurre en animales, e incluso cuando son

usados en humanos, como especie de destino<sup>19,20</sup>. Por esta variabilidad analítica, incluso los estándares de fabricación obligan a evaluar unidades diferentes del mismo modelo simultáneamente<sup>19,21</sup>.

Además, en el caso de los roedores, si se basa el diagnóstico de la DM y su evolución en medidas puntuales de la glucemia, no existe una definición actual consensuada de cuál es el punto de corte para considerar a un roedor como diabético (ver Tabla 2). Ello constituye un tema de debate recurrente en múltiples foros científicos, y resultando complicado consensuar cuando, además, existe tanta disparidad entre los aparatos de medida usados<sup>22</sup>. Normalmente, se asume un valor diagnóstico de diabetes que muchas veces es arbitrario, para cada modelo, y que se determina tras un período de ayuno, que también varía según el autor<sup>23</sup>. Una recomendación útil al enfrentarse a un modelo de diabetes, sería no limitarse a considerar como alta, normal o baja una determinación concreta, sino que, en cada modelo, con el mismo glucómetro y tiempo de ayuno, se compare la glucemia obtenida frente a controles sanos. Alternativamente, si se está realizando un seguimiento del modelo, se deben comparar los valores de glucemia obtenidos antes de la inducción de la enfermedad. En este caso, y como referencia general, podría definirse la presencia de diabetes si entre ambos grupos existe una diferencia de dos veces la desviación estándar respecto a la media<sup>24</sup>.

## CONCLUSIONES

La DM se ha convertido en un problema sociosanitario de gran relevancia en sociedades modernas tanto por su alta frecuencia como por sus consecuencias, lo que ha provocado un gran incremento en las investigaciones científicas en esta área. De acuerdo con PubMed, solo en el año 2019 se publicaron hasta 24.805 artículos mencionando Diabetes Mellitus.

A pesar del gran avance realizado en nuevas tecnologías de reemplazo, gran cantidad de estas investigaciones siguen dependiendo del uso de animales de investigación, fundamentalmente roedores. La facilidad del uso de estos modelos y la extensa bibliografía existente lleva en ocasiones a los

investigadores a utilizar protocolos erróneos para la inducción de la DM, normalmente, asociados a la falta de profundidad en el conocimiento global de la enfermedad.

Por todo ello es necesario tomar en consideración las siguientes cuestiones a la hora de elegir, diseñar y llevar a cabo los estudios<sup>3</sup>:

- Fijar el objetivo del estudio, ¿qué tipo de DM se va a estudiar? T1DM, T2DM, GDM u otras.
- Elegir los modelos de acuerdo al objetivo, ¿qué especie es más adecuada a nuestro objetivo?, ¿qué mecanismo de inducción refleja mejor la enfermedad o los signos que queremos valorar?, ¿cuál es el mejor momento para llevar a cabo la inducción?...
- Y, finalmente, si se hace uso de glucómetros para medir la glucemia, es recomendable siempre monitorizar la evolución de la enfermedad de manera comparada con un grupo control sin DM, sobre todo cuando se busca desarrollar una hiperglucemia leve o moderada en T2DM, y menos, quizá, para más severa en T1DM.

En definitiva, parece evidente que en la investigación en DM es necesario aún establecer unos estándares metodológicos y específicos en el reporte de información, que permitan fomentar la traslacionalidad y reproducibilidad de los resultados entre laboratorios.

## BIBLIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus, ADA Clinical Practice Recommendations. Diabetes Care* 36 Suppl 1, S67-74 (2013).
2. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
3. Lilao-Garzón J., Valverde-Tercedor C., Muñoz-Descalzo S., et al. *In Vivo and In Vitro Models of Diabetes: A Focus on Pregnancy. Adv Exp Med Biol*, 2021;1307:553-76.
4. Brito-Casillas Y., Melián C., and Wägner A. M. *Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models. Endocrinol y Nutr.* 2016;63:345-53.
5. Song B., Scheuner D., Ron D., et al. *Chop deletion reduces oxidative stress, improves  $\beta$  cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. J Clin Invest.* 2008;118:3378-89.
6. Hu S., Wang L., Yang D., et al. *Dietary Fat, but Not Protein or Carbohydrate, Regulates Energy Intake and Causes Adiposity in Mice. Cell Metab.* 2018;28:415-31.e4.
7. Surwit R.S., Kuhn C.M., Cochrane C., et al. *Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. Diabetes.* 1988;37:1163-7.
8. Lozano I., Vand der Werf R., Bietiger W., et al. *High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. Nutr Metab.* 2016. doi:10.1186/s12986-016-0074-1.
9. Michlin M., Argav-Frenkel L., Weinstein-Fudim L., et al. *Maternal n-acetyl cysteine intake improved glucose tolerance in obese mice offspring. Int J Mol Sci.* 2020;21.
10. McPherson N. and Lane M. *Metformin treatment of high-fat diet-fed obese male mice restores sperm function and fetal growth, without requiring weight loss. Asian J Androl.* 2020;22(6):560-8.
11. Zhang Y.J., Zhao H., Dong L., et al. *Resveratrol ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and fatty acid oxidation via ATM-AMPK axis in skeletal muscle. Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23:9117-25.
12. Raza G.S., Maukonen J., Makinen M., et al. *Hypocholesterolemic Effect of the Lignin-Rich Insoluble Residue of Brewer's Spent Grain in Mice Fed a High-Fat Diet. J Agric Food Chem.* 2019;67:1104-14.
13. Xu D., Jiang Z., Sun Z., et al. *Mitochondrial dysfunction and inhibition of myoblast differentiation in mice with high-fat-diet-induced pre-diabetes. J Cell Physiol.* 2019;234:7510-23.
14. Nyavor Y., Estill R., Edwards H., et al. *Intestinal nerve cell injury occurs prior to insulin resistance in female mice ingesting a high-fat diet. Cell Tissue Res.* 2019;376(3):325-40.
15. Fougerat A., Pan X., Smutova V., et al. *Neuraminidase 1 activates insulin receptor and reverses insulin resistance in obese mice. Mol Metab.* 2018;12:76-88.
16. Chang G.R., Chen W.K., Hou P.H., et al. *Isoproterenol exacerbates hyperglycemia and modulates chromium distribution in mice fed with a high fat diet. J Trace Elem Med Biol.* 2017;44:315-21.
17. Li H.Y., Liu Y.X., Harvey L., et al. *A mouse model of gestation-specific transient hyperglycemia for translational studies. J Endocrinol.* 2020;2441:501-10.
18. Togashi Y., Shirakawa J., Okuyama T., et al. *Evaluation of the appropriateness of using glucometers for measuring the blood glucose levels in mice. Sci Rep.* 2016;6:1-9.
19. Brito-Casillas Y., Figueirinhas P., Wiebe J.C., et al. *ISO-Based Assessment of Accuracy and Precision of Glucose Meters in Dogs. J Vet Intern Med.* 2014;28:1405-13.
20. Morley L.A., Gomez T.H., Goldman J.L., et al. *Accuracy of 5 Point-of-Care Glucometers in C57BL/6J Mice. J Am Assoc Lab Anim. Sci.* 2018;57:44-50.
21. Brito Casillas Y., Expósito-Montesdeoca A.B., Sánchez M., et al. *Glucose meters in diabetes research: accuracy evaluation of portable blood glucose meters in mice. 55th Annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD); 2019;16-20.*
22. *What blood glucose level is considered diabetic in mice? [https://www.researchgate.net/post/What\\_blood\\_glucose\\_level\\_is\\_considered\\_diabetic\\_in\\_mice](https://www.researchgate.net/post/What_blood_glucose_level_is_considered_diabetic_in_mice).*
23. Han B.G., Chuang-Ming H., Tchekneva E., et al. *Markers of glycemic control in the mouse: Comparisons of 6-h- and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c. Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(4):E981-6.
24. Cardinal L.J. *Determining true difference between treatment groups. J. Community Hosp Intern Med Perspect.* 2016;6(1):30284.