



Universitat Autònoma de Barcelona

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR DE LA
FACULTAT DE VETERINÀRIA**

CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA

**MANIPULACIÓ GENÈTICA DEL
PÀNCREES PER A L'ESTUDI DE LA
DIABETIS**

MERITXELL MORRÓ LARRUBIA

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert i del Dr. Eduard Ayuso Lopez en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària i en el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

MERITXELL MORRÓ LARRUBIA

FÀTIMA BOSCH i TUBERT

EDUARD AYUSO LOPEZ

Març del 2014

BELLATERRA

*Als meus pares,
pel seu suport incondicional en tot moment.*

Amb aquestes línies s'acaba un camí molt llarg que va començar fa uns anys quan entrava a la universitat per primera vegada. Però tot aquest camí no hagués estat possible sense la companyia de les persones del meu voltant i que han estat presents al llarg de les diferents etapes.

En primer lloc m'agradaria agrair als directors d'aquesta tesi doctoral que sense ells no hagués estat possible. A la Dra. Fàtima Bosch per haver-me donat l'oportunitat de realitzar-la en el seu grup d'investigació. Gràcies també per la dedicació, empena i entusiasme per la ciència, i sobretot, per la gran energia que et caracteritza i fer que aquesta tesi fos millor gràcies als teus consells i experiència. I al Dr. Eduard Ayuso per ajudar-me i ensenyar-me a desenvolupar aquesta tesi doctoral. Gràcies per treballar mà a mà tant al laboratori com en l'estabulari i les converses sobre els resultats obtinguts, fins i tot en la distància. Les meves sinceres gràcies a tots dos per haver-ho fet possible.

Així mateix, voldria expressar el meu reconeixement als doctors Víctor Nacher, Anna Pujol i Alba Caselles, la meva comissió de seguiment del doctorat, per les valuoses aportacions que em van fer per millorar la present investigació.

Vull agrair especialment a les reines del pàncrees, Alba, Cristina, Vero i Mercè. Una part d'aquesta tesi us la dec a vosaltres!!!! Alba, moltíssimes gràcies per la discussió de resultats i per dedicar part del teu temps a desenvolupar-me com a científica. Cristina i Vero, no oblidaré mai les hores a l'estabulari compartides en aquell metre quadrat! Ni a quiròfan amb les amigues NOD. I a tu Mercè, per ajudar-me en els inicis amb els ratolinets quan fèiem illots totes juntes!

Al CBATEG, després d'aquests anys he trobat una nova família que sempre estarà al meu costat, la Family.cat, Ricardo, Albert, Gerard, Laia, Cristina i Alba. Tot i la distància que ens separa i ens separarà segurament en un futur, sempre estarà allà compartint tant els bons moments com els dolents. *Fue el tiempo que pasaste con tu rosa lo que la hizo tan importante.*

A les "supernenas", Tami, Sara i Cristina, que vam iniciar aquest camí juntes i que poquet a poquet cada una va aconseguint allò que ens vam proposar un dia. Gràcies per compartir les inquietuds tant personals com professionals durant aquest camí. Molts ànims Cristina i Sara per la recta final!

Al Joan, a la Serena i a la Ramona, gràcies a les vostres hores i dedicació durant aquest camí heu format part en la realització d'aquesta tesi.

A tots els companys del laboratori de la 3a. Estefanía, per la teva generositat i ajuda a la recta final d'aquesta tesi. Vicky, pels teus consells al final d'aquest camí. Clàudia, Sandra, Sara, Cristina, Vero, Alba per als bons moments que hem passat al laboratori. Als del despatx, Carles, Miquel, Ivet, Laia i Alba per haver-me ajudat i compartit amb mi riures enmig del procés d'escriptura d'aquesta tesi. Als del laboratori de la 4a planta, Tura, Sylvie, Efrén i Sergio. I al David i Angel per fer-me riure tant enmig del passadís i les escales contínuament. I als mes nous, Marisa, Cristian, Jordi, Víctor MPS, Víctor Adipós i Iván. I als que ja no hi son però que en el seu dia van aportar el seu granet de sorra, Iris, David, Judith, Tami, Albert Ruzo, Joel, Mercè, Ariana i Pilar.

Maria, Xavi i Luca, gràcies per totes les cèl·lules necessitades i els virus produïts. A la Marta i a l'equip del Dr. Jesús Ruberte i a la Lorena per tota la histologia realitzada. A la Unitat d'Animals Transgènics, Anna Pujol, Anna Arbós i Sandra Turón sense la vostra feina una part d'aquesta tesi no s'hagués pogut realitzar. A la Montse per la seva ajuda en la burocràcia en molts moments. Moltes gràcies a tot l'equip del SER-CBATEG. Gràcies Pedro per dirigir el servei.

Gràcies als companys de la cinquena planta. Gràcies Miguel i Assumpció. Al personal de l'SLIPI i seguretat.

Gràcies a tots els amics Cristina M, Xavi, Pau, Laura, Màxim, Nerea, Sandra, Carol, Sara, Laia, Clara, Cristina D, Mari Carmen, a tots els Biofrikis, Albert T, Cristian, Berta, Albert H, Cristina E, Miguel, Joan, Laia, Lara, Lluís, Marina i Pipio. A tots vosaltres per estar al meu voltant compartint experiències i per ser-hi!

Finalment, vull agrair als meus pares, germà i parella, àvia i a tota la família per creure en mi, recolzar-me en tot moment i formar-me com la persona que soc. No voldria deixar-me els avis que ja no hi son, a tots ells aquesta tesi és d'ells, els hi hauria fet moltíssima il·lusió veure a la seva neta un dia com avui. Gràcies a tots vosaltres de tot cor!

Aquesta tesi ha estat possible gràcies a la beca predoctoral FPI finançada pel Ministerio de Ciencia e Innovacion. Les investigacions s'han realitzat gràcies a la financiació rebuda del Ministerio Ciencia e Innovacion, Plan Nacional I+D+I (SAF2008-00962) i pel projecte europeu EFSD/JDRF/ROCHE: *Young Investigator Award in Innovative Therapy for Type 1 Diabetes*.

-	
aa	Aminoàcids
AAV	Virus Adenoassociat
AAVr	Vectors virals recombinants AAV
Ad	Adenovirus
AdFG	Adenovirus primera generació
ADP	Adenosina difosfat
Ag	Antigen
Amy1	Amilasa 1
APC	Cèl·lula presentadora d'antigen
Arx	<i>Aristaless related homeobox</i>
ATP	Adenosina trifosfat
AUC	Àrea per sota la corva
BB	BioBreeding
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca²⁺	Calci
CBATEG	Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementària
CMV	Citomegalovirus
Con-	Control negatiu
CsCl	Clorur de Cesi
CTL	Limfòcits T citotòxics
DDAO	7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one)
DDAOG	7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one)-β-D-galactopyranoside)
DEPC	Dietilpirocarbonat
DMSO	Dimetil sulfòxid
DNA	Àcid desoxirribonucleic
dNTP	Deoxinucleòtid trifosfat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Gen primerenc 1 (<i>Early gene 1</i>)
E2	Gen primerenc 2 (<i>Early gene 2</i>)
E4	Gen primerenc 4 (<i>Early gene 4</i>)
EEUU	Estats Units
ERCP	Colangiopancreatografia endoscòpica retrògrada
ESC	<i>Embryonic Stem Cells</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fwd	<i>Forward</i>
Gcg	Glucagó
Gck	Glucocinasa
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GLP-1	<i>Glucagon like peptide-1</i>
GLP-1R	<i>Glucagon like peptide-1 receptor</i>
GLUT2	Transportador de glucosa 2
GTT	Test de tolerància a la glucosa

-	
gv	Genomes virals
HCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
HdAd	<i>Adenovirus helper dependent, Gutless</i> o de tercera generació
Hes1	<i>Hairy and enhancer of split-1</i>
HGF	Factor de creixement d'hepatòcits
hIns	Promotor del gen de la insulina humana
Hv	<i>Helper virus</i>
Iapp	<i>Islet amyloid polypeptide</i>
ID	Administració intraductal
IFN-γ	Interferó γ
IGF-I	Factor de creixement similar a la insulina I
IL-6	Interleucina 6
Ins1	Gen de la Insulina 1 de ratolí
Ins2	Gen de la Insulina 2 de ratolí
iPS	Cèl·lules pluripotencial induïdes
ITR	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
IV	Administració intravenosa
kb	Kilobases
L3	Transgènic RIPI/ β -Gal línia 3
L4	Transgènic RIPI/ β -Gal línia 4
L5	Transgènic RIPI/ β -Gal línia 5
LacZ	Gen que codifica per la β -Galactosidasa
LV	Lentivirus
Maf B	<i>v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B</i>
MCP-1	Monocyte Chemoattractant protein-1
MHC	Complexa Major d'Histocompatibilitat
miRNA	micro RNA
MLDSTZ	<i>Multiple Low Dose Streptozotocin</i>
MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the Young</i>
MOI	<i>Multiple of infeccion</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance imaging</i>
mRNA	RNA missatger
NeuroD1	<i>Neurogenic differentiation 1</i>
Neurog3	<i>Neurogenin 3</i>
ng	nanograms
Nkx 2.2	<i>NK2 homeobox 2</i>
Nkx 6.1	<i>NK6 homeobox 1</i>
Nkx 6.2	<i>NK6 homeobox 2</i>
NO	Òxid Nítric
NOD	<i>Non-obese diabetic mice</i>
o/n	<i>over night</i>
°C	Graus centígrads
P³²	Fòsfor 32
Pax 4	<i>Paired box 4</i>
Pax 6	<i>Paired box 6</i>
pb	Parell de bades
PBS	Tampó fosfat-salí

-	
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pdx-1	<i>Pancreatic duodenal homeobox 1 gene</i>
PEG	Polietilenglicol
Pfu	<i>Plaque formin units</i>
PMSG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
PNM	Factors de transcripció <i>Pdx1</i> , <i>Neurog3</i> i <i>MafA</i>
PP	Polipèptid pancreàtic
Ptf1a	<i>Pancreas specific transcription factor, 1a</i>
qPCR	PCR quantitativa
RB	<i>Roller bottle</i>
Rev	<i>Reverse</i>
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
RIP-I	Promotor del gen de la insulina I de rata
RLU	Unitats Relatives de Llum
RNA	Àcid ribonucleic
RNasa	Ribonucleasa
rpm	revolucions per minut
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SeAP	<i>Secreted Alkaline Phosphatase</i>
SEM	Error estàndard de la mitja
Slc2a2	Transportador GLUT2
Sox9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
ssDNA	DNA de cadena senzilla
STZ	Streptozotocina
T1D	Diabetis tipus 1
T2D	Diabetis tipus 2
TE	Tampó tris-EDTA
tg	Transgènic
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	Cèl·lules T reguladores
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UAT	Unitat d'Animals Transgènics
UI	Unitats internacionals
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultraviolats
V	Volts
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>
WPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosid
β-Gal	β -Galactosidasa

I. PRESENTACIÓ	1
II. INTRODUCCIÓ	3
1. EL PÀNCREES	3
1.1. Estructura i funció del pàncrees.....	3
1.2. Desenvolupament del pàncrees endocrí.....	7
1.3. Funcionalitat de la cèl·lula β	9
1.3.1. Regulació de l'expressió del gen de la insulina.....	9
1.3.2. Regulació de la secreció de la insulina	11
1.4. Regulació de la massa de cèl·lula β	13
2. DIABETIS.....	15
2.1. Diabetis tipus 1	16
2.1.1. Patogènia de la diabetis tipus 1	16
2.1.2. Models animals	17
2.1.2.1. Ratolins NOD (<i>Non Obese Diabetic</i>): Models de diabetis espontanis	18
2.1.2.2. Models induïts experimentalment.....	18
2.2. Tractaments actuals per a la diabetis tipus 1	20
3. TERÀPIA GÈNICA.....	22
3.1. Introducció a la teràpia gènica.....	22
3.2. Vectors virals	23
3.3. Vectors virals adeno-associats	25
3.3.1. Biologia dels AAVs.....	26
3.3.2. Vectors AAV recombinants.....	27
3.4. Vectors Adenovirals.....	31
3.4.1. Biologia dels Adenovirus.....	31
3.4.2. Vectors Adenovirals <i>helper</i> dependents (HdAd).....	33
4. MANIPULACIÓ DEL PÀNCREES PEL TRACTAMENT DE LA DIABETIS	35
4.1. Teràpia gènica per a la diabetis tipus 1.....	35
5. TÈCNiques D'ANÀLISI DE LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES <i>IN VIVO</i>	39
5.1. Gens reporters per a l'anàlisi de la massa de cèl·lula β	41

5.1.1. GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>).....	42
5.1.2. β -Galactosidasa.....	43
5.1.3. Luciferasa.....	43
5.1.4. seAP (<i>Secreted Alkaline Phosphatase</i>).....	44
III. OBJECTIUS.....	45
IV. RESULTATS	46
1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DELS ANIMALS TRANSGÈNICS RIP-I/β-GAL	46
1.1. Construcció del gen quimèric RIP-I/ β -Gal	46
1.2. Generació dels ratolins transgènics mitjançant microinjecció d'òcits fecundats	47
1.3. Obtenció del ratolí transgènics RIP-I/ β -Gal	48
1.4. Anàlisi de l'expressió del gen de la β -Gal als illots pancreàtics dels ratolins transgènics	50
1.5. Anàlisi de l'absència d'expressió del transgèn en algunes cèl·lules β	52
1.6. Anàlisi de la possible toxicitat de la β -Gal a les cèl·lules β	54
2. TRANSDUCCIÓ AL PÀNCREES AMB VECTORS VIRALS HdAd.....	58
2.1. Generació dels HdAd per recombinació homologa	58
2.2. Amplificació dels vectors HdAd generats	60
2.3. Caracterització de la transducció al pàncrees pels HdAd que expressen GFP	63
2.4. Monitorització no invasiva de la transducció de cèl·lules i l'expressió a llarg termini dels vectors HdAd al pàncrees.....	69
3. TRANSDUCCIÓ AL PÀNCREES EXOCRÍ MITJANÇANT VECTORS AAV	73
3.1. Generació de vectors virals AAV9 amb el gen marcador seAP.....	73
3.1.1. Comprovació de l'expressió <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	74
3.1.2. Efecte de la via d'administració i la soca de ratolí utilitzada	75
3.2. Transdiferenciació del pàncrees exocrí en cèl·lules productores d'insulina mitjançant vectors AAV	77
3.2.1. Generació dels constructes i dels vectors virals AAV9.....	77
3.2.1.1. Comprovació de l'expressió de PNM a ratolins sans.....	78

3.2.2. Injecció AAV9-PNM a ratolins diabètics	82
3.2.3. Injecció combinada de AAV9-PNM i vectors Adenovirals a ratolins diabètics.....	86
V. DISCUSSIÓ	90
VI. CONCLUSIONS.....	103
VII. MATERIALS I MÈTODES.....	105
1. MATERIALS	105
1.1. Animals.....	105
1.2. Soques bacterianes.....	105
1.3. Sondes de DNA	105
1.4. Anticossos	106
1.5. Reactius	106
1.6. Plasmidis.....	107
2. MÈTODES	109
2.1. Tècniques bàsiques de DNA	109
2.1.1. Preparació del DNA plasmídic	109
2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció	109
2.1.3. Desfosforilació de fragments de DNA	110
2.1.4. Generació d'extremes roms de fragments de DNA.....	110
2.1.5. Construcció de molècules híbrides: lligació i recombinació homologa	110
2.1.6. Transformació en cèl·lules competents <i>E.coli XL2-blue</i> i <i>E.coli BJ5183</i>	111
2.1.7. Obtenció del DNA i purificació	111
2.2. Cèl·lules eucariotes en cultiu	112
2.2.1. Cèl·lules Ins-1	112
2.2.2. Cèl·lules MIN-6.....	112
2.2.3. Cèl·lules 266-6	112
2.2.4. Cèl·lules HEK-293.....	112

2.2.5. Cèl·lules Cre116.....	113
2.2.6. Transfecció de DNA en cèl·lules en cultiu	113
2.3. Generació del ratolí transgènic RIP-P/ β -Gal.....	114
2.3.1. Superovulació de femelles B6SJL.....	114
2.3.2. Obtenció d'embrions de ratolí d'una cèl·lula.....	114
2.3.3. Microinjecció en pronucli.....	114
2.3.4. Aïllament del DNA genòmic dels ratolins.....	114
2.3.5. Anàlisi del DNA per <i>Southern Blot</i>	115
2.3.5.1. Digestió i electroforesi del DNA genòmic	115
2.3.5.2. Transferència del DNA a la membrana	116
2.3.5.3. Marcatge radioactiu de les sondes de DNA	116
2.3.5.4. Hibridació de la membrana.....	117
2.3.5.5. Rentats de la membrana i revelats	117
2.3.6. Anàlisi del DNA per PCR	117
2.4 Producció, purificació i caracterització dels vectors virals.....	119
2.4.1. Producció i purificació dels AAV	120
2.4.2. Producció i purificació dels Adenovirus <i>helper</i> dependent (HdAd) ..	120
2.4.3. Quantificació dels vectors virals per PCR quantitativa	121
2.4.3.1. Quantificació dels AAV per PCR quantitativa	121
2.4.3.2. Quantificació dels HdAd per PCR quantitativa	122
2.4.4. Quantificació de les càpsides virals AAV per <i>silver staining</i>	123
2.5. Anàlisi del nombre de còpies del transgèn	124
2.5.1. Extracció del DNA genòmic	124
2.5.2. Quantificació del nombre de còpies del transgèn per qPCR	124
2.5.2.1. Generació de la recta patró de referència.....	124
2.5.2.2. Quantificació del nombre de còpies del transgèn per qPCR. 124	
2.6. Injecció <i>in vivo</i> dels vectors virals.....	125
2.6.1. Administració retrògrada pel ducte pancreàticobiliar.....	125
2.6.2. Administració intravenosa	126

2.7. Anàlisi d'expressió del mRNA per qPCR	127
2.7.1. Extracció de RNA total.....	127
2.7.2. Síntesi de cDNA.....	127
2.7.3. PCR quantitativa (qPCR).....	127
2.8. Anàlisi de l'expressió de la β -Galactosidasa	129
2.9. Determinació de paràmetres sèrics	129
2.9.1. Glucosa	129
2.9.2. Insulina.....	129
2.9.3. seAP	130
2.10. Test de tolerància a la glucosa	130
2.11. Inducció a la diabetis experimental mitjançant STZ	130
2.12. Anàlisi immunohistoquímic del pàncrees	131
2.13. Quantificació de la transducció al pàncrees	131
2.14. Determinació de la massa de cèl·lula β	132
2.15. Anàlisi estadístic.....	132
VIII. BIBLIOGRAFIA	133

I. PRESENTACIÓ

La diabetis és una de les malalties més comunes. Els dos tipus principals són, la tipus 1 i la tipus 2, i es caracteritzen pel desenvolupament d'hiperglucèmia. En la diabetis tipus 1, aquest increment en la glucèmia apareix com a conseqüència d'una disminució de la massa de cèl·lula β i una pèrdua de funcionalitat dels illots. Per tant, restablir una massa de cèl·lula β capaç de mantenir una adequada homeòstasi de la glucosa és un dels principals reptes de la medicina regenerativa pel tractament de la Diabetis. Per avaluar l'eficàcia d'aquests nous tractaments seria de gran interès disposar d'eines que permetin manipular genèticament el pàncrees *in vivo*.

En aquest estudi, s'han desenvolupat tres aproximacions clau per a l'anàlisi de la massa de les cèl·lules β i de les cèl·lules acinars del pàncrees: un ratolí transgènic RIP-I/ β -Gal el qual expressa la β -Galactosidasa (β -Gal) de forma específica a les cèl·lules β del pàncrees, i vectors virals Adeno-associats (AAV) i Adenovirus *helper* dependents (HdAd) que expressen diferents gens marcadors.

En primer lloc s'ha generat el ratolí transgènic RIP-I/ β -Gal per poder avaluar possibles canvis en la massa de cèl·lula β al llarg del temps i/o en processos patològics com la diabetis. De tots els animals fundadors obtinguts, només una de les línies, la L5, la de menor nombre de còpies presentava una elevada expressió de la β -Gal als illots pancreàtics, sent aproximadament el 90% de cèl·lules β del illot doble positives Ins⁺/ β -Gal⁺.

També, s'han dissenyat i produït vectors virals HdAd i AAV que expressen el gens reporters GFP o seAP (*secreted Alkaline Phosphatase*) específicament a les cèl·lules β o exocrines segons els promotor utilitzat, promotor d'insulina (hIns) o Elastasa, respectivament.

Els HdAd, a diferència dels AAV, presenten una major capacitat de clonatge però la seva producció és més complexa. Després de la transducció via intraductal del pàncrees dels vectors HdAd-CMV-GFP o HdAd-Elastasa-GFP es va observar una disminució significativa de l'expressió de GFP als pocs dies de la injecció, degut a una forta infiltració limfocitària causada principalment per l'expressió de GFP. En canvi, quan s'utilitzava un marcador no immunogènic com la seAP l'expressió era detectada a llarg termini. Aquests resultats demostren per primer cop que la transducció del pàncrees exocrí i endocrí mitjançant vectors HdAd és possible i que l'expressió del gen d'interès es manté durant un període de temps llarg.

En paral·lel als estudis amb els HdAd, s'ha demostrat la transducció al pàncrees exocrí i endocrí quan s'injectaven els vectors de serotip 9 (AAV9) per via intraductal i intravenosa a ratolins. Animals injectats per via intraductal amb els vectors AAV9-Elastasa-seAP mostraven nivells de seAP circulants a llarg termini. Aquests vectors han estat útils per avaluar les diferències de transducció segons la via d'administració i la soca de ratolí utilitzada, observant-se una elevada transducció en els ratolins C57Bl6 independentment de la via d'administració.

La regeneració de cèl·lules β *in vivo* ha esdevingut un mètode prometedor per al tractament de la diabetis tipus 1. Donada l'eficiència i seguretat de les estratègies de transferència gènica mitjançant els vectors virals AAV, es van utilitzar aquests vectors per a transferir gens clau per a reprogramar les cèl·lules acinars del pàncrees cap a un fenotip β en ratolins diabètics immunocompetents. En aquest estudi es van utilitzar tres factors de transcripció claus implicats en el desenvolupament de la cèl·lula β : Pdx1 (*Pancreas and duodenal homeobox gene-1*), Neurog3 (*Neurogenin 3*) i MafA (PNM).

Es va observar un increment estadísticament significatiu de l'expressió ectòpica dels tres factors al pàncrees i un increment de l'expressió de la insulina, tot i que no hem aconseguit disminuir la hiperglucèmia dels ratolins C57Bl6 diabètics. Però quan es van coinjectar els AAV9-PNM amb un Ad5-nul no codificant es va aconseguir una reprogramació parcial de les cèl·lules exocrines en productores d'insulina observant-se una expressió significativa del gen *Ins1* (*Insulina 1*) i una disminució de les glucèmies dels ratolins diabètics.

Per tant, les aproximacions desenvolupades en aquesta tesi han demostrat que la manipulació genètica del pàncrees, tant de les cèl·lules endocrines com de les exocrines, poden ser molt útils per avaluar possibles teràpies per a la diabetis o en altres malalties pancreàtiques.

II. INTRODUCCIÓ

1. EL PÀNCREES.

El pàncrees és alhora una glàndula exocrina i endocrina productora de diverses hormones, com la insulina i el glucagó, essencials en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa. De la mateixa manera, el pàncrees és també un òrgan digestiu ja que secreta el suc pancreàtic amb enzims digestius que ajuden a l'absorció de nutrients i a la digestió a l'intestí prim.

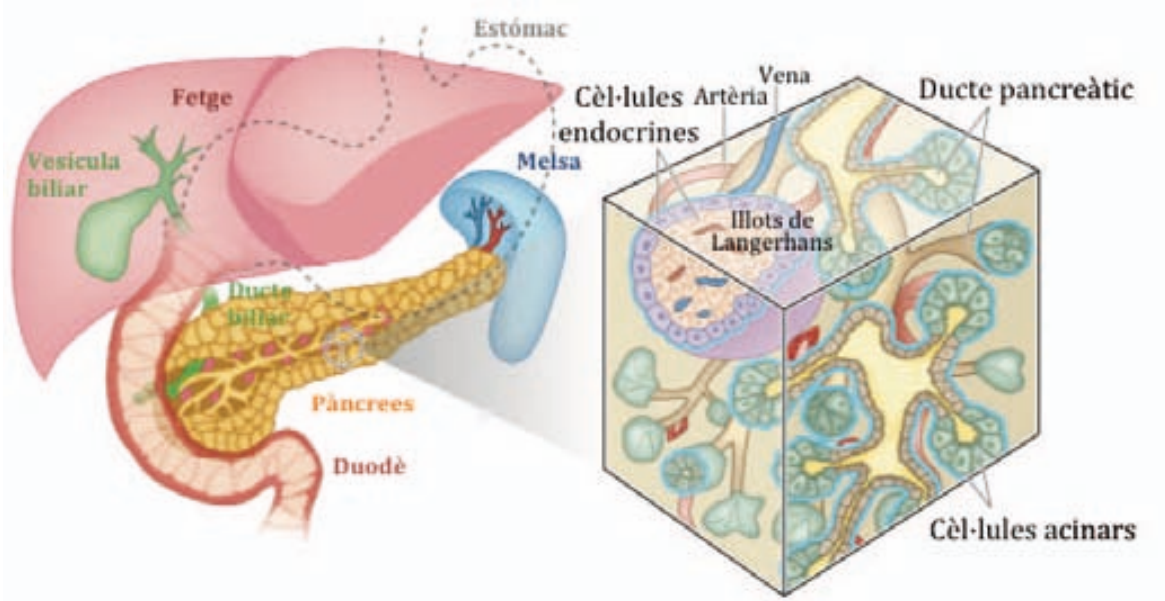
1.1. Estructura i funció del pàncrees

El pàncrees és una glàndula composta on es poden diferenciar tant histològicament com funcionalment dues parts: el **pàncrees exocrí**, format pels acinis i els conductes, que participen en la secreció d'enzims digestius al duodè; i el **pàncrees endocrí**, format pels illots de Langerhans, que secreten hormones al torrent circulatori.

El pàncrees exocrí constitueix aproximadament el 80-85% del total de les cèl·lules pancreàtiques, formant agrupacions de cèl·lules epitelials, les cèl·lules acinars, orientades en sentit radial formant una llum, el lumen, que comunica amb els conductes pancreàtics. Aquests formen un entramat de comunicació entre els acinis i la llum del duodè (Figura 1). La funció de les cèl·lules acinars és la de síntesi, reservori en els anomenats grànuls de zimògen, i la secreció dels enzims digestius pancreàtics actius com les proteases, lipases, amilases i zimògens inactius com la tripsina i elastasa. La xarxa ramificada de l'epiteli ductal transporta els enzims digestius i els ions bicarbonat a l'intestí, on contribueixen a la digestió dels aliments. L'últim fragment del conducte pancreàtic està compartit amb el conducte de la vesícula biliar que transporta la bilis alcalina des del fetge. La bilis facilita el treball de les lipases pancreàtiques.

La fracció endocrina del pàncrees constitueix només un 1-2% de la massa total del pàncrees adult i està format pels illots de Langerhans, tot i que es poden trobar cèl·lules aïllades (Rahier *et al.*, 1981). Estan dispersos irregularment en tot el parènquima exocrí, amb major densitat a la zona de la cua del pàncrees (Figura 1). Els illots estan envoltats per una càpsula de teixit connectiu característica que els aïlla del teixit exocrí i els ajuda a mantenir la seva integritat estructural. Aproximadament, hi ha un milió d'illots repartits en els pàncrees humans, entre 1000 i 2000 a les rates i uns 500 en els pàncrees dels ratolí. Cada illot conté aproximadament 2000 cèl·lules productores d'hormones (Dor *et al.*, 2004; Halban *et al.*, 2004).

El sistema digestiu està format pel tractat gastrointestinal i pel sistema biliar. El tractat gastrointestinal està format pel buccal, faringe, esòfag, estómac, duodene, intestí del·le, còlon i recte. El sistema biliar està format pel fetge, vesícula biliar i ducte biliar. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí.

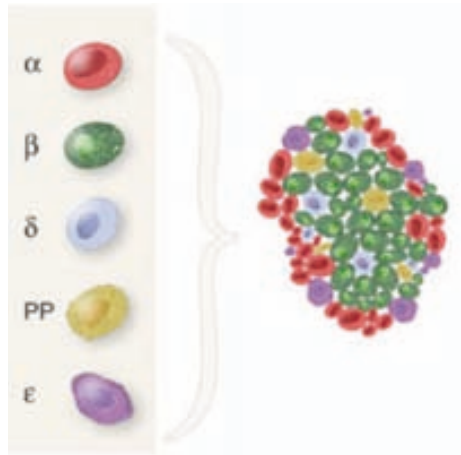


El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí.

2

El sistema digestiu està format pel tractat gastrointestinal i pel sistema biliar. El tractat gastrointestinal està format pel buccal, faringe, esòfag, estómac, duodene, intestí del·le, còlon i recte. El sistema biliar està format pel fetge, vesícula biliar i ducte biliar. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí. El pàncrees és un òrgan que pertany al sistema digestiu i al sistema endocrí.

2



?

MAGD3, FVGAPVAGDARBOI VC DUPGRHVPA. dGueu B. dAFqGueou Teder. óThFóueqno'fæó2Feql c hl rer
 óid. ue77 rteda r6,22. .te2u h. u ue777 d Tred77 c777 pmp1 F77, rn, icda S2

?

ueó2 **PYQOÀRF3** 2e qde. l deó2NF óFóF 2e ó2d Aer 2 t dFh ueó2 óper. de ueó2Nd. 2261 r 2
 æó2 í ó2AFru r. ó2er. 2 ó2d .l óf ó2ue2À82 ó785 2 er. de 2Fe2 2Nl c e2hedeóer. 2e2185 2
 ue2eó2no'fæó2er ul qdF eó, 22d6ó à 2c22p688122 es r 2c22p69K-6S2

ueó2 **PYQOÀRF3** 2 óAeder 2 dFq tG22eó2d q óFer 2 2b 2hed2ndT 2ue2Nd. 2h r6. TFTr. 2
 ue2212 ó85 2er 2h r à22 2Nl c e2h r6. TFe2Ber 2e2285 2ue2d. ue2eó2no'fæó2er ul qdF eó, 2
 "2d6ó à 2c22p688122 es r 2c22p69K-6S, 22ed2 2o 2F uFq2Gue2o 2t dFq ter C622T2o 2
 t dFq rel tnreó22uFd r. 2eueiFr 2Nal dc lr 2 dFq tG2nd uFM 2hed2 2no'fæó2Fo 242 r. í 2eó2
 r 2eó2ue2 dFq ó 2er 2ó r 2h r6. r. 2er 2eó2Fc r6ue2-82 29682 tOud22er 2eó2d .l óf ó2ue2
 À8x9712 t Ouq2

2d2 dFq tG22eó2d 2F óFóF 2 q. Fer 2 r. tCr 2h c er. 2óet lr622ó. .2ue22Nq. 2AT. 2ue2
 2F u2 2uF2er 2ueiFr 22 2er 2Fr 2eó. . 2 ó2 er. q2GS2 Ftc er. 2 2u2c 2r Fe2Ber 2eó2 2eó2ue2
 t dFq ó 2deó2heq. 2a c er., 22 2F óFóF 2 ó22er 2h 2al dc lr 2zFe2 ó2q h p2ue2u2c 2r F22eó2
 r 2eó2ue2 dFq ó 2er 2ó r 22F uF22u2 Aól d22G2h l ó. hd ruT 2ue2 2 dFq ó 2 2eó2no'fæó2,

ueó2 **PYQOÀRF2** k2zFe2 dehdeóer. er 2e22985 2er 2Td. ó2aFc r62 2Aeder 2o 2
 ól c .l ó. .2r , 22óFr 2al dc lr 2c hl d. r. 2Fe2etFo 2 2hd uFq2G22u2 2Aed c er. 2u2odeó2
 al dc lr eó22ra 2e22b 2e qdeq2Gue2 dFq tG22eó2d 2F óFóF 2er. de 2u2odeó, 22zFe2eó2no'fæó2
 eó. r 2TF ueó2 2 2hed2ndT 22hd h2ueó2h h'ó2 d62ueó22d. ó, 2

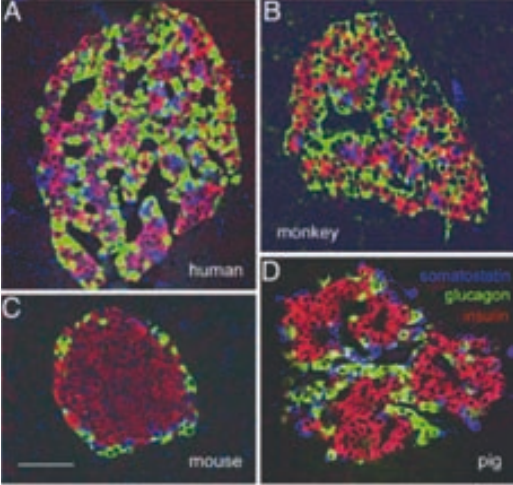
ueó2 **PYQOÀRF2** 2222"15 2ue2æó2no'fæó2er ul qdF eó2aFc r eó22hd uFe2Ber 2e22
 hl ónh. Tu2h r qdey. 2h 2Fe2í 2e seq. eó22etFo ul d62er 2Nq. 2AT. .2e qde. l d 2ue22h yr qdeé222 o deó2
 t 2yr uFæó2, 22no'fæó22TF ueó2 2o 2hed2ndT 22hd h2ueó2h h'ó2 d62ueó22d. ó, 22Nl dc lr 2

óu óAed Er deóhl ó. ú ó er. qTC,úa uec lód. ZFeq.F r r aeóedó.ec edàGó2
qer.d dheddeuFTó r r r r teó. ú ó er.ó22 ..eda c 2022/688/S,

2 eó2PYGQARFv2”β95 S-2hdh uFeBer 2ál dc lr 2tdeór 2”2d ul 2 2022/688: S2
eó. F Fo ul d ue2b 2s c 22u. d. IAFMeó2 2N.E d2 2NF.edT d2ue2vd ,222c íó2 2c íó26N 2
uec lód. ZFe2í 2Fr 2h hed2qer.d 2er 2b 2detFo qTCue2nal c eCó. 2ue2b 2t 2fql ó 222o 2
t 2fqc T 2er 2seq. d 2er 2. 2a c er. 2óAed c er. 2uír 2ó2r 22d t 2ó2 2022/68892d t 2ó2 2c 2
2022/688/22rt 2022/688982 u 2 2022/688-S22hl 2ó2T 2a c er. 2ú 2óAed c er. 2ue2t 2f q t G2
2Bq 2c 2ueuFT. 2 2ó c . ló. . 2 22222a F r t 2022/6889922 ued 2022/688-22 ued 2022/68
6881S,22ú od 2A ru 2ó2a r 2c lód. 2seq.eó2hd. eq. l d 2q r. d 2ú hl h. l 2ó2ue2qno“F eó22á 2
”2d r . 2 2022/6887S22l Ade 2 2etered qTCueóhdí 2ue2b 2ueó. dFqTC 2h r qdey. 2q 2r uFM 2
hed2ydc 2ó2l c 2ueó. de. l El. l qT 2222S22d r . 2022/68898S,

22a 2Fr 2po d 2eh d qTCue2hFó2ue2qno“F eó2 2u 2eder. 2ó2et T r 2ó2ue2vd . 2e 2Fe2
2ó2ttede 2Bz Fe2a 2a 2FAu 2a 2T r 2ó2r . Cc 2Z Fe2er 2u 2d . 2ueó2l 2óet ul d 222d q 2022/6889K71S22
zFeó. 2 dz FTeq. Fd 2er 2q 2óec Ao 2er 2d 2t Freó2c hóq qT r 2ó2Fr qT r 2ó2’2 Aded 2 2022/68
688ÀS,

2 2 2ueó2d hqTC r. edT d 2ue2eó. dFq. Fd 2ueó2d . 2ue2d 2óet ul d 222T Fd 2S 2ó2e 2hFó2
u 2d . 2hd. l. gh 2ueó2d T 2er 2t lo 2ó2Ade 2ue2b 2e. 2hed 2e 2B. e 2B 2r 2d r 2a dT A 2T . 2er. de 2
eó2hnq 2e 2ó2hed 2Fe 2 2 2q c hl 2ó2TCue2e 2ó2no“F eó22ueó. dFq. Fd 2ue2vd , 22r 22d . 2ó2Fc r 2ó22
er 2hd 2c . 2ó2l 2Fc r 2ó22T Fd 2 2222S2e 2ó2no“F eó22 2l 2eó. r 2t dFh ueó2er 2e 2Fq 222er er 2
c í 2ó2no“F eó2hd uFq. l de 2ue2t 2f q t G2Z Fe2er 2e 2ó2d 2óet ul d 222’ 2l 2óq 2 2022/68898S, 22ú od 2
A ru 2e 2ó2hd . 2ue2hl d q 2óec A 2er 2eó. d 2l dc . 2hed 2u 2aed 2e 2ó2FAFr T . 2ó2c í 2ó2ne. Te 2ó2Fe 2
óú 2óec A 2er 2ó2hd . 2ue2d . l q 222T Fd 2 2S22 Aded 2 2022/688ÀS,



2 MAG25x20 V2AR22DUMRGNDUF2AR2A 2RGRUV2RFCYP RF22+2, 22l. l td s’Eó2ue2t 2hd 2q l h 2q l rsl q 2’2e 2eqT r 2ó2
Ch. 2Fe 222uc S2Z Fe 2c lód. er 2e 2eqT r 2ó2h r qdey. 2Fe 222ehde 2er. . 2e 2ó2c A 22d . 2ue2e 2r t eda r 2ó2u 2a Fc y 222-2
hd 2c . 2l 2Fc y 222-2d . l q 222-2h l d q 222-2, 22u h. . 2ue2e Aded 2e. 2022/688ÀS,

1.2. Desenvolupament del pàncrees endocrí

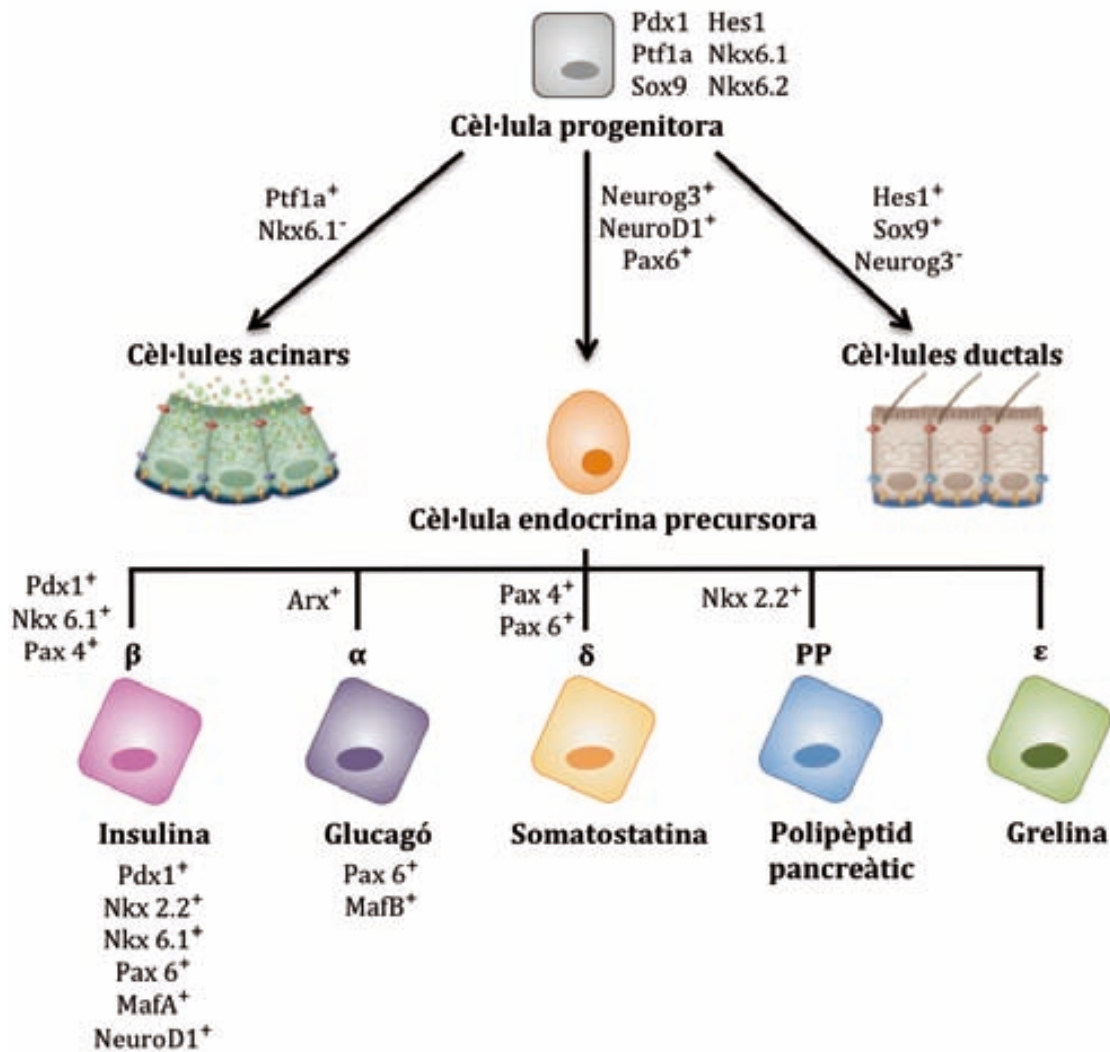
El pàncrees es forma a partir de cèl·lules de l'endoderm, una de les tres capes primitives que es forma durant l'estadi embrionari inicial. En els ratolins, el desenvolupament del pàncrees esdevé morfològicament evident al voltant del dia 8.5e de l'estadi embrionari (e). A partir del dia 12.5e fins al naixement l'epiteli del pàncrees continua expandint-se i es ramifica en una xarxa tubular altament ordenada i complexa. Aquests canvis morfològics són paral·lels a la diferenciació de les cèl·lules endocrines, acinars i ductals. Al final de l'estadi embrionari el pàncrees del ratolí ha adquirit en gran mesura l'organització topològica de l'òrgan madur, amb les cèl·lules acinars al voltant de la xarxa de conductes i els agregats de les cèl·lules endocrines disperses per tot l'òrgan.

Les cèl·lules endodèrmiques progenitores, a diferència de moltes cèl·lules epitelials, no expressen el gen *Shh* (*Sonic hedgehog*) (Hebrok *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998) ni l'àcid retinoic (RA) (Martin *et al.*, 2005; Molotkov *et al.*, 2005). Posteriorment en aquestes cèl·lules endodèrmiques s'expressen determinats factors de transcripció els quals determinen el llinatge pancreàtic donant lloc a les cèl·lules progenitores pancreàtiques. Aquestes cèl·lules expressen els factors de transcripció *Pdx1* (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*), *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, *Ptf1a* (*pancreas specific transcription factor, 1a*), *Sox9*, *Hes1* (*hairy and enhancer of split-1*), entre altres (Bonal *et al.*, 2008; Jorgensen *et al.*, 2007; Mansouri *et al.*, 2012; Seymour *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2007). La producció d'aquests factors de transcripció està altament regulada i relacionada entre ells ja que la eliminació d'un d'ells afecta a múltiples components durant desenvolupament del pàncrees. (Seymour *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2012). En aquest estadi encara no té l'estructura macroscòpica del pàncrees madur ni tampoc s'han diferenciat els diferents tipus cel·lulars que proporcionen la funcionalitat a l'òrgan (Figura 4).

Un conjunt de cèl·lules progenitores pancreàtiques expressaran el factor de transcripció de la *Neurogenina 3* (*Neurog3*) el qual marca l'inici de la diferenciació cel·lular. Segons els nivells activats de la *Neurog3* i l'activació de la via de senyalització Notch les cèl·lules aniran cap a la diferenciació de cèl·lules endocrines o ductals. Una elevada senyalització de la via Notch promou la senyalització dels gens *Hes1* i *Sox9* provocant una inhibició de *Neurog3* i per tant, la diferenciació de les cèl·lules progenitores cap a cèl·lules ductals. En canvi, una menor activitat de la via Notch promou només l'activació de *Sox9* permetent així l'activació de *Neurog3* donant lloc al llinatge de les cèl·lules endocrines. (Shih *et al.*, 2012). Per altra banda, l'expressió del factor de

.d r óqdThqGncA222B FaTqGue222ui 392 deóqno'Fáo2hd c l F2B dc qGue222no'Fáo2
 qT dóue222yr qdeó2uFo,222l α ó. d c 222p68992mal F222p6887S,222T Fd 222S2

222 deóqno'Fáo222eFdl t/0222no'Fáo222erul qdF eó2hd ter Tl deó2bet l r ó222Bhdeó2G2ue222
 u2eder. ó2s q. l dó2ue222. d r óqdThqG222eó2 u2eder qT d r 222er 222eó2 122. ThFó2ue222no'Fáo222
 q d q. edg. 222Feó,222ó3 q l dó2ue222d r óqdThqG2222i H22222i L22222ui 392ue. edc T d r 222eóqno'Fáo222
 β222er. de222Fe2222i 2222imc222p nm222 p222c 2223, a , 222i H222ue. edc T dy222eóqno'Fáo222α,222F r 2222eó2
 qno'Fáo222erul qdF eó2hd ter Tl deó222Bhdeó222B 222l c AT qGue222 B: 22222 BÀ222l r dy222d q222eó2
 qno'Fáo222hd uFq. l deó2ue222l c . l ó. . T 22222 F r 222Bhdeó222r 222DB6,6222ó222eder qT d r 222r 222eó2
 qno'Fáo22222,222T α er. 222Fr 222hedqer. . te222c l o 222he. T222eó2u2eder qT d r 222er 222eó2qno'Fáo222e222
 hd uFq. l deó2ue222deó2r , 222l r 222c222p688-2222 r ól Fd 222c222p6896222a 222c222p6889/22222a 222c222
 222p6889/S,222T Fd 222S,222



222 NÀGD222 x222 RFRUEÍ ÀCDQ RUV222A TRGRUP DP d222AROC HUPGRRF222eóqno'Fáo2hd ter Tl deó2ue222erul uedc 222d ài ó222
 ue222Bhdeó2G2ue222ue. edc T . ó2s q. l dó2ue222. d r óqdThqG222óNq A dy222u2eder qT r. 222er 222Fr 222qno'Fo 222hdeqFdól d 222
 erul qdF 222qT d222uFq. q222

Progressivament, els vasos sanguinis i les fibres del sistema nerviós perifèric migren també cap a les porcions endocrines i exocrines del teixit.

1.3. Funcionalitat de la cèl·lula β

En els últims anys, l'estudi dels factors de transcripció que s'expressen en les cèl·lules β ha portat a concloure que, aquestes proteïnes, poden tenir un doble paper per a l'organisme: 1) durant l'embriogènesi determinarien la diferenciació de les cèl·lules epitelials a progenitors endocrins fins a cèl·lules β madures; i 2) en l'adult, mantenen el fenotip de les cèl·lules β madures i asseguren la regulació específica de les hormones en cada una de les cèl·lules endocrines. Per tant, els mateixos factors de transcripció que regulen la transcripció dels gens i el bon funcionament de les cèl·lules β d'un individu adult, estan també implicats en la diferenciació d'aquestes cèl·lules durant el desenvolupament embrionari del pàncrees. (Mansouri *et al.*, 2012; Shih *et al.*, 2013; Ziv *et al.*, 2013).

Les cèl·lules β són les principals responsables del control de l'hemostàsia de la glucosa per mitjà de la síntesi i secreció de la insulina. Aquesta hormona és la que permet contrarestar la hiperglucèmia (Kulkarni *et al.*, 2004). Després de la secreció d'insulina en el torrent sanguini es produeix l'estimulació de la utilització de glucosa en els teixits perifèrics, múscul i teixit adipós i la inhibició de la producció de glucosa hepàtica en conjunció amb l'activació de la síntesi de glicogen en aquests teixit.

1.3.1. Regulació de l'expressió del gen de la Insulina

En individus adults, el gen de la insulina s'expressa de forma específica a les cèl·lules β dels illots de *Langerhans*, tot i que també s'han detectat nivells d'expressió molt baixos a cervell, retina i timus (Fan *et al.*, 2009; Mehran *et al.*, 2012).

La seqüència del gen de la insulina està altament conservada durant l'evolució. Així, la insulina dels vertebrats més primitius i la de l'home difereixen únicament en unes poques bases. A la majoria d'espècies es presenta com un gen d'una sola còpia. En el cas dels humans, per exemple, es localitza en el cromosoma 11, entre els gens de la tirosina hidroxilasa i el del factor de creixement similar a la insulina-II (IGF-II). Els rosegadors, en canvi, tenen dues còpies del gen de la insulina: la insulina 1 (Ins1), sembla ser el resultat d'una duplicació gènica del gen original de la insulina i es localitza al cromosoma 19; i la

TóFóF 66S2FebedT b al c Cd t b TóFóF aFc r q dE u d c l ó c
 "er.ml da c 66K-ÀS, . q u Tq d h e d b t . e T h d . e M z Feó. ó ul ó t er ó t er er
 u Feder. ó h . d l r ó N B h d e ó G - e d t er i d t T a r ó 6 e ó u e . e q . h d T h e o t T e c A d t r d
 e- , 1 6 N B h d e ó T h e o t u e h y r q d e e ó s e . t e T F ó e r q r à e d t er T ó 9 T T b e à
 e B h d e ó G t T e c A d t r d T e K , 1 T e r u F o ó T l c í ó 6 N B h d e ó T h e o t u e h y r q d e e ó T u e
 de. T Fuu c 66KK/ eol Fd 66KK/S,

NóheqST . N B h d e ó G u e d t er u e z o T ó F ó F e ó . y q l r . d l o u h e d c è o T h e ó z
 ó z (n r q e ó t e t F o u l d e ó h e T F e F r e T e r s q l d ó u e d r ó q d h q G F e il d T y d T c e r .
 e ó . r q d E u e ó r e d e F h d c l . l d , e e ó è o T h e ó t e t T r ó u e d h d c l . l d T c h l d r . ó z
 h e d N q . T a q G T q l r . d d u e d t er u e z o T ó F ó F e r u e ó . z F e r z N ó h e q T d e a è a y r q T - e ó z
 d e t T r ó 6 6 / 6 9 6 9 T T F d 1 S , 2 2 s q l d u e d r ó q d h q G H 6 N F r e T e z e ó t e t T r ó z
 d z F e ó e r T u e b d e t G h d c l . l d / T q . T b d r ó q d h q G e . e d ó e r 6 6 K K : S , H
 . c A í F r . e d q q T r e c A e s q l d u e d r ó q d h q G d i , H e o z F ó N F r e T e b d e t G 9 u e d
 h d c l . l d z e b . l r 6 6 K K : S , z F e ó . e ó u F e ó t e t T r ó 6 / 6 9 S F r . c e r . e c A b d e t G 9
 ó G r e e ó e a c e r . ó z c í ó T c h l d r . ó u e d e t F o q G u e z N B h d e ó G e r z d e ó h l ó . z t d f q l ó ,
 N q . T a u l d u e b d e t G 9 z e ó . . T u e r . T q . T c e s q l d u e d r ó q d h q G 4 2 2 A d l . c z
 6 6 8 6 S 2 e r b d e t G 6 6 N T F r e T e r e ó s q l d ó 6 6 L 7 3 7 r u e d 6 6 K K 7 S , z d
 h d c l . l d u e z o T ó F ó F e c A í z q l r . í z e e c e r . ó z z u e z d e ó h l ó . z z z q , 2 2 1 . ó z z F e ó . ó z
 s q l d ó F . e d q q T r e r e r . d e e ó z c A u F e d e r . ó z s q l d ó z F e ó G r z b d e t u d e t F o . ó h e d
 c è o T h e ó z h d y c e . d e ó , z r z u e ó z d e t F o u l d ó z c í ó T c h l d r . z u e z l . ó z z F e ó . ó z s q l d ó z ó z
 h d C h T d f q l ó T T F d 1 S ,

Promotor de la Insulina I de ratolí



MAG 2 x 2 2 FL À R Q D 2 A R 2 D 2 G R M 2 C C Í Q Í V Í G 2 C R M 2 O A Í G 2 A R 2 O M U 2 A R 2 O 2 U F À O U D 2 2 2 A R 2 G M 2 G 2 z z (n r q e ó z
 d e t F o u l d e ó T s q l d ó u e d r ó q d h q G c í ó T c h l d r . ó z z F e ó 6 N T F r e T e r , z z ó z z e z F u d e ó z d e h d e ó e r z e ó z
 ó z (n r q e ó t e t F o u l d e ó h e d q . e g ó . z F e ó z e ó s q l d ó u e d r ó q d h q G u e ó z h l . ó z F e ó N F r e T e r z q u d e t G e ó . r z
 e r à l o . ó z A d e h e e ó z e ó h e q T e ó t e t T r ó , T T F d z u h . u u e z z T o l r z c 6 6 8 8 / S ,

z b g r . e ó T u e z o T ó F ó F e ó F r h d q í ó q l c h e B z F e z F à l d f q d b b d c q G u e u F e ó z
 c l n q F e ó z h d e q F ó l d e ó z o z h d e h d T r ó F ó F z T z o z h d T r ó F ó F , z z r z q l h z . d r ó q d T z o z
 h d e h d T r ó F ó F h ó z u e d T A l ó c z e . T q e r u l h o ó c y . T q r r ó u e t d u u h e d h d . e ó e ó z
 e ó h e g z z F e ó z z F e z ó e h d e r z e z h n h . T u z ó e r b z u N z F e ó . z c r e d z e ó z . d r ó s l d c u z z
 h d T r ó F ó F , z z z F e ó . z ó h d q e ó z u z T r ó F ó F h T r ó u e ó z d y r F o z z F e h d l a e r e r u e z N h d e z

de Golgi. En aquests grànuls les proteases, activades per un pH àcid, trenquen el pèptid de connexió anomenat *pèptid C*, que uneix les cadenes A i B de la insulina, alliberant-se la insulina madura amb activitat biològica. Aquesta insulina madura està constituïda per 51 aminoàcids repartits en les dues cadenes polipeptídiques A (21aa) i B (30aa) unides per dos ponts disulfur intercatenaris.

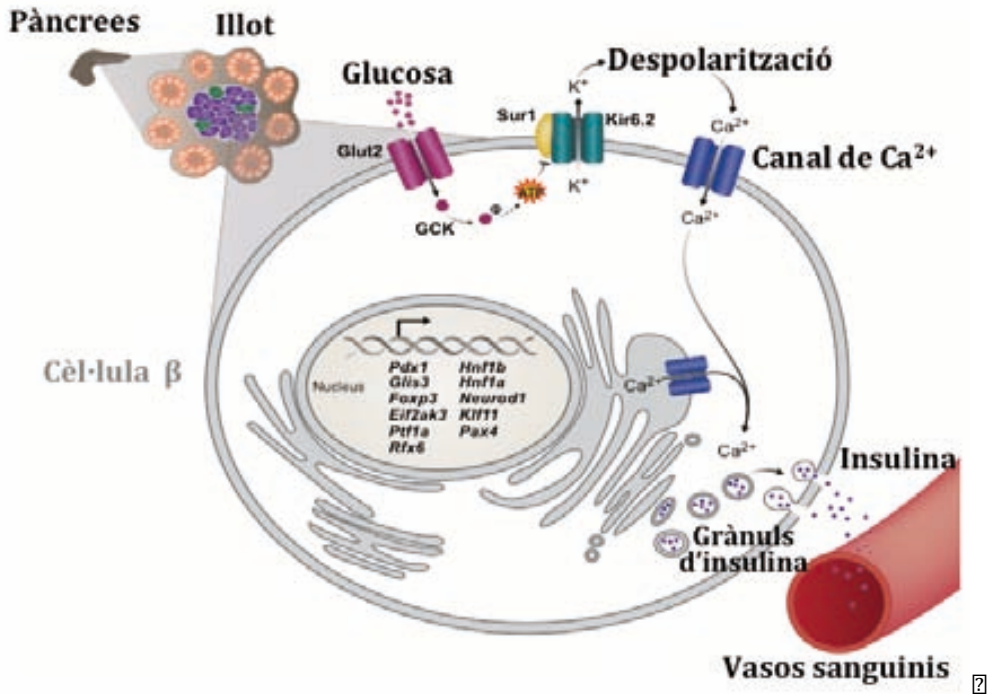
La glucosa actua com a regulador de la síntesi i secreció de la insulina actuant bàsicament a través de 3 mecanismes: 1) mitjançant un increment selectiu de la transcripció del gen de la insulina, alterant l'expressió i la localització intracel·lular dels diferents factors de transcripció; 2) estabilitzant de forma selectiva els RNA missatgers (mRNA) de la insulina i 3) estimulants la traducció dels mRNA de la insulina de forma ràpida i selectiva.

La cèl·lula β actua com un sensor dels canvis en la concentració de glucosa dins d'un rang fisiològic. A més de la glucosa, existeixen altres factors reguladors: els nutrients (com la manosa o els aminoàcids leucina i arginina), els neurotransmissors (acetilcolina i *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP)) i les hormones (glucagó i *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1)). Així doncs, d'una banda, la funció dels illots està controlada per molècules que es troben en el sistema circulatori i que arriben de forma paracrina (com el glucagó) o endocrina (com els nutrients) a través de la circulació sanguínia de l'illot. I, per l'altra, per fibres del nervi vague (parasimpàtic) i pel nervi esplènic (simpàtic) (Begg *et al.*, 2013; Caicedo *et al.*, 2013).

1.3.2. Regulació de la secreció de la insulina.

Està molt ben caracteritzat el mecanisme pel qual els nivells de glucosa en sang de l'organisme estimula la secreció de la insulina (Figura 6). La glucosa entra dins de la cèl·lula β a través del transportador de glucosa GLUT-2, que presenta una afinitat molt elevada per aquest monosacàrid i permet la seva entrada. Un cop dins de la cèl·lula β , la glucosa és fosforilada per l'enzim Glucoquinasa (GCK) donant glucosa-6-fosfat, la qual entra a la glucòlisi. L'enzim GCK o Hexoquinasa IV es caracteritza per una elevada *K_m* per la glucosa (de 5 a 8 mM), de manera que té la màxima activitat a concentracions postprandials i, no pot ser inhibida pel producte de la seva acció, la glucosa-6-P (Printz *et al.*, 1993). Així doncs, el transportador GLUT-2 i la GCK actuen conjuntament com a sensors de la glucosa, modulant la secreció d'insulina enfront els canvis de concentració de glucosa circulants.

Al òcc eueb d fql ó d r ób d nódfo p d d ài óueb d f q c o b t e d q e ueb d e aó b e t e r e d d ó h d e q t c e r . d n f q d e c e r . u e o e d . T d d d o e d d e d z f e q a b d ó e q d e q u n f ó f o r , d n f t c e r . u n d d d r . d q e ó f o d h d l à l q f r u e o h l ó o d t e q t e u e b c e c a d r z f e u f e b b z a e d f d u e o e q r ó u e q a t z 60 s u e h e r u e r . ó u e a l o . t e d d h d l à l q r . d e r . d u u e d d 60 t e d d r ó e z (e r . f r q d e c e r . u e b d e a d h l r q e r . d q t e d n f . e d d d u e b d n ó f o , d n f c e r . d l . z f e ó . q ó q u u e b e r b ó a n g r d d q d b s f ó t e a e o d d y r f o ó u e d e q d e q t c a d b e c a d r h o ó c y . t q d d e q d e q u n f ó f o r , d n f f d a s ,



MAGD xPRGRP dAR d UFÀOU dRU GRFCÍ FVDE d d MÀPI FD d fql ó e r . d d d n ó f o p d d ài ó u e b d . d r ó h l d u l d d d d x d d d ó s l d b u u e d d e r e t e f q l z f r ó d d d d s , d d f q l ó x a s l ó s . e r . d d d f q c o b t e d q e u e b d e a ó b f t c e r . r . d n d d d c d d l r ó e z (n r q t u e b d h f i u u e d d . T d d d o e d d e d z f e r ó u e q d e x u e h e r e r . ó e ó z f e r t e o a n g r f r u e o h l o d t e q t e u e b c e c a d r h o ó c y . t q , d e o a l d e o e o e q r ó u e b d 60 ó n a d e r d e r . d e r d r ó e d 60 d n ó f o p , d n f q d e c e r . e r b d h l r q e r . d q t e u e b 60 t r u f e b b z s f ó t e a e o d d y r f o ó u n f ó f o r d c a d b e c a d r h o ó c y . t q d d t o f q d d d d 89 / S ,

d n f q d e c e r . d y h t u u e o a t e a e o a u e d f q l ó e r b r t q l c h l d f r u e o h l ó . d a s y ó t q e r b d e q d e q t c a d b e c a d r h o ó c y . t q d d e d s ó e z í f r e c h l d r . s f r q t e s t o t c t t q u e o e t r q t e d y h t u u e d f q l ó d d q f o r . d d a r d d d d 889 S d r e o a n g r d e o a n l q o a t t r f . ó d / x l t t r f . ó s d d q l d d e o h l r d d n b l q t l ó t u e b d d r ó f o r d q f c f o u e r d e o a t d y r f o ó u e b d e q d e q t c a d b e c a d r h o ó c y . t q d d e q d e q u n f ó f o r q n ó f c e o b d d d d c d n u e o q d t d r . e d d c e r . , d d e t l r s ó e u n o a e d c e r . u n f ó f o r d c í ó b l ó . t t f u d h e d ó t e r . u f d r . d l . d d t h e d f q n c t d o a u e t f u d d d g r . e ó t h l ó . e d d d ó e q d e q t c a d b e c a d r h o ó c y . t q d d e . t e u d d , , d d f o e à l d o e d q t e z f e q s e q . t b s f r q t r ó t . u e b d e o a n ó f c e o b d h r q d e y . z f e ó d e o e q r t c e u n q t e u e b d r ó f o r d h l . u l r d d d q d d e f ó d h d l a e c e o t e . a c o b o d d u e o e r à l d h c e r . u e u t a e . t o e o t f ó ,

bf x RMADP d ARDQ DFDARPYGÀD

Er eohyr qdeeo uFo hhl Ao qGue qno'fo Brl eoe r.í qh r. r. Gz Fe óz uTryc Tq eó.yóh.c eó q q rà bhed qNu h. dxoe eoe r e qeóóT .ózc e. ACóE FeóóT c r.er T b r l dc l t ónc T, r r Fr r u a Tu F b b b c óó ue qno'fo B eó.yóh.c eó q Fr T qdec er. ue b b c óó hnd hnd qeóó ó ue hnd ó sed qG r el t nreó T u beder qT qG b h d T ue qno'f eó hnd e q dól deó S b hnd b h hnd d c s T ' Ftc er. ue b b c Tu ue b b qno'fo S, b ed od A ru eó Gr Fr ue u F q q G ue b b c óó ue qno'fo B b b d ài ó ue Nhl h.l ó T N. d s T ue eó qno'f eó z de u F q q G ue b b c Tu S b b l d d c p 88: e e d c p 88- e a l ueó c p 88 S b " T F d S b



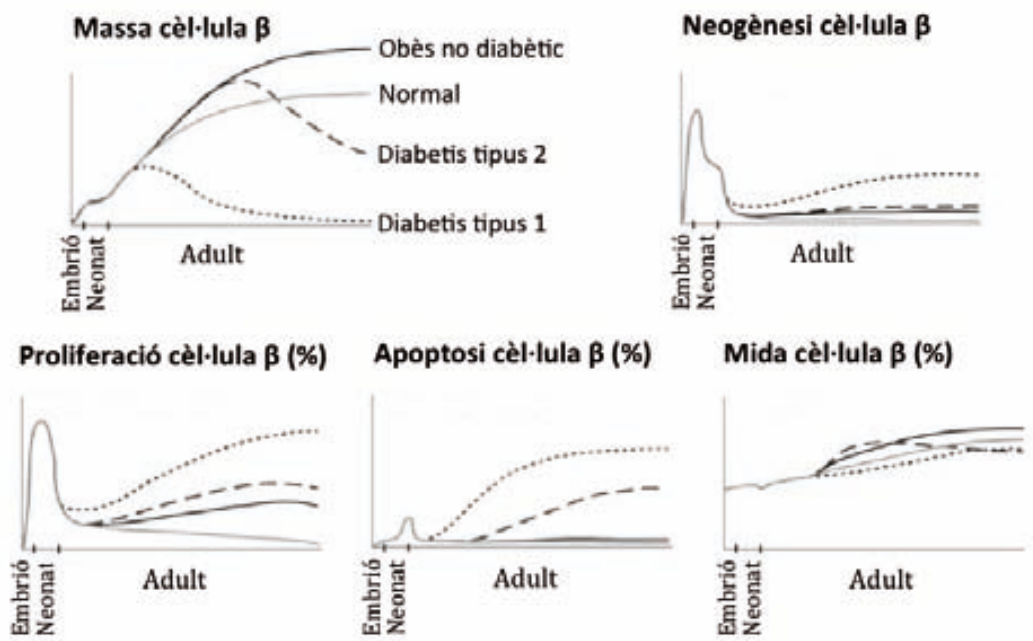
MADP/ x RMADP d ARDQ DFDARPYGÀD b hnd ó sed qG b r el t nreó T b h hnd d s T ' Ftc er. er b b c óó ue qno'fo B c er. de z Fe b Nhl h.l ó T N. d s T b b c T Fe b er, b

eó ue b c Ad t nreó T b ó z ue . uFo b hnd u Fe b b r r qdec er. r e. ue b b c óó ue qno'fo B b b eó f d z Fe b r u a Tu F b de b, b b beder qT qG b b de h o q q G ue b qno'fo B b ó hnd u Fe b b h d r q h x er. u u F d r. b b c Ad t nreó T b q l c er p b b u b c T F b b b h d T b ue b r b e c er., b b de h o q q G ue b eó z qno'f eó z b b r. b b d l c e q l c b er b eó b d . l ó r ó z ó z c l o z T h l d r., b b r r qno'fo B b uFo b er q q ru q T r ó z s b T c t z Feó z r l dc ó z b b. B ue b de h o q q G b ó z c l o z A T b, b eó h d ó ue b r b e c er. b a b a b r b u b c T F q q G ue b b c óó ue b qno'f eó z Fe b er. der b q q ue qno'f eó d er b b d r ó q G b 90 z z q d e c r r b c p 887 b D e x b D u b c p 89/S, b b. Fu b er b . eó b b . l ó r ó ue b r eó l ó ue b z Fe b b B ue b er l à q G ue b eó z qno'f eó z b b u Fr b /5 b d u T b hnd r. b b d er l à q G b l. eó hnd u Fe b b q u b eó z " T e t l l u b c p 89 K K 1 S, b b r q r à b er b . l ó r ó u Fr b r b o r l c í ó b 95 ue b eó z qno'f eó z b eó z de h o q b d u T b e. b c p 881 S, b b b a b. z Fe b eó u b e d n r q eó ue hnd ó sed q G eó ue F b b q h q T . ue b eó hnd Ch eó z qno'f eó z er. d d d q q ue qno'f eó d, b b h d T ue b l ueó z r T e ó z . d r ó t n r q ó z b b b a b. z Fe b eó z q l d ó z Fe b d e t F e r b b hnd ó sed q G ue b qno'f eó z b b u F d r. b b c Ad t nreó T h l u d er b eó d u b e d r. ó z ó z z Fe b d e t F e r b b hnd ó sed q G ue b hnd ó ue b r b e c er. b b q d e c r r b c p 887 S, b b . b b b b de h o q q G b e c A o b e d b b a T b il d T y d T b h e d b z F eó z d c er b l à eó z qno'f eó z b b l d c p 88: S, b

Er a Fc r ó b b ó. T z Fe b o z uFo ó l à eó Fr q h b b r b d c . b . eó ue qno'f eó z b b t b e A í b r l b ó hnd u Fe b b de h o q q G b er b b eó. ue b b a Tu b uFo b b r l h b c p 898 b

al der 2022/2023/2024 Aó. r. 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100

h qT . nFr d r r e h e d r . er r e a t o o n d o f o b n e h r u e b l r . g f c er . n f d r . n u . u f o i o t c h l d r . h e d r . er r . er . n e c l o y o t n e d i f q l o t t e a e r q t c u e d n t a e . t . e d r . a e r e r t h q t . n o e d d o o n d o f o b o e t l r o e o r e q e o t . o n r o f o r , r e o . u t a e o t . n r q t t b r o f o r q l c n e c a d y o t a e o t . o i o t q l r e t f . z f e z c o o n d o f o b f t c er . 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100



MAG x UHQ PDARDEQ DFFDARPYGÀOB x o o dys r o e h e o e r . er e o q r a t h d l B E . o n e d o o n d o f o b n e h r u e b l r . g f c er . n f d r . n u . u f o i o t c h l d r . h e d r . er r . er . n e c l o y o t n e d i f q l o t t e a e r q t c u e d n t a e . t . e d r . a e r e r t h q t . n o e d d o o n d o f o b o e t l r o e o r e q e o t . o n r o f o r , r e o . u t a e o t . n r q t t b r o f o r q l c n e c a d y o t a e o t . o i o t q l r e t f . z f e z c o o n d o f o b f t c er . 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100

?

?

?

?

2. DIABETES MELLITUS.

La diabetis és un grup de malalties metabòliques caracteritzades per la presència d'hiperglucèmia com a conseqüència dels defectes en la secreció d'insulina, en l'acció de la hormona insulina, o bé d'ambdues. La hiperglucèmia crònica de la diabetis s'associa amb danys a llarg termini, disfunció i insuficiència de diversos òrgans, especialment els ulls, ronyons, nervis, cor i vasos sanguinis (American Diabetes Association *et al.*, 2013).

Actualment es considera que existeixen en el món més de 380 milions d'individus diabètics i es preveu que aquest nombre es veurà incrementat fins a més de 590 milions l'any 2035 segons la Federació Internacional de Diabetis.

La majoria dels casos de diabetis es poden classificar en dues àmplies categories: la diabetis tipus 1 i la diabetis tipus 2. La **diabetis tipus 1** és causada per la destrucció autoimmune de les cèl·lules β del pàncrees. En canvi, la **diabetis tipus 2** és causada per la resistència a la insulina en els teixits perifèrics (principalment pels músculs, teixit adipós i fetge) i per la secreció inadequada de l'hormona d'insulina. Els defectes en la secreció de la insulina observada en la diabetis tipus 2 són probablement a causa de la combinació d'ambdós, la disfunció cel·lular i una reducció en la massa de cèl·lules β (Butler *et al.*, 2003). De manera que, tant a la diabetis tipus 1 com la diabetis tipus 2, en última instància, es dona una insuficient massa funcional de la cèl·lula β .

A més a més de la diabetis tipus 1 i 2, la classificació actual de la malaltia inclou altres malalties menys prevalents com ara la diabetis gestacional, que es defineix com qualsevol grau d'intolerància a la glucosa amb inici o primer reconeixement durant l'embaràs; i altres tipus de diabetis causades per defectes monogènics que afecten a la funció de les cèl·lules β . Aquestes formes monogèniques de la diabetis es caracteritzen sovint per l'aparició d'hiperglucèmia a una edat primerenca (generalment abans de l'edat de 25 anys) i se'ls coneix com diabetis d'inici en la maduresa dels joves (MODY, *Madurity Onset Diabetes of the Young*). Les MODY es caracteritzen per la secreció d'insulina alterada amb defectes mínims o per la seva absència en l'acció de la insulina. S'han identificat fins a sis anomalies a locis genètics en diferents cromosomes. La forma més comuna s'associa a mutacions en un factor de transcripció hepàtic, el factor nuclear d'hepatòcits (HNF)-1 α (MODY 3) Una segona forma està associada a mutacions en el gen de la glucoquinasa (MODY 2). Les formes menys comunes són el resultat de mutacions en altres factors de transcripció, com HNF-4 α , HNF-1 β , el factor promotor d'insulina (IPF)-1, i NeuroD1. (American Diabetes Association *et al.*, 2013).

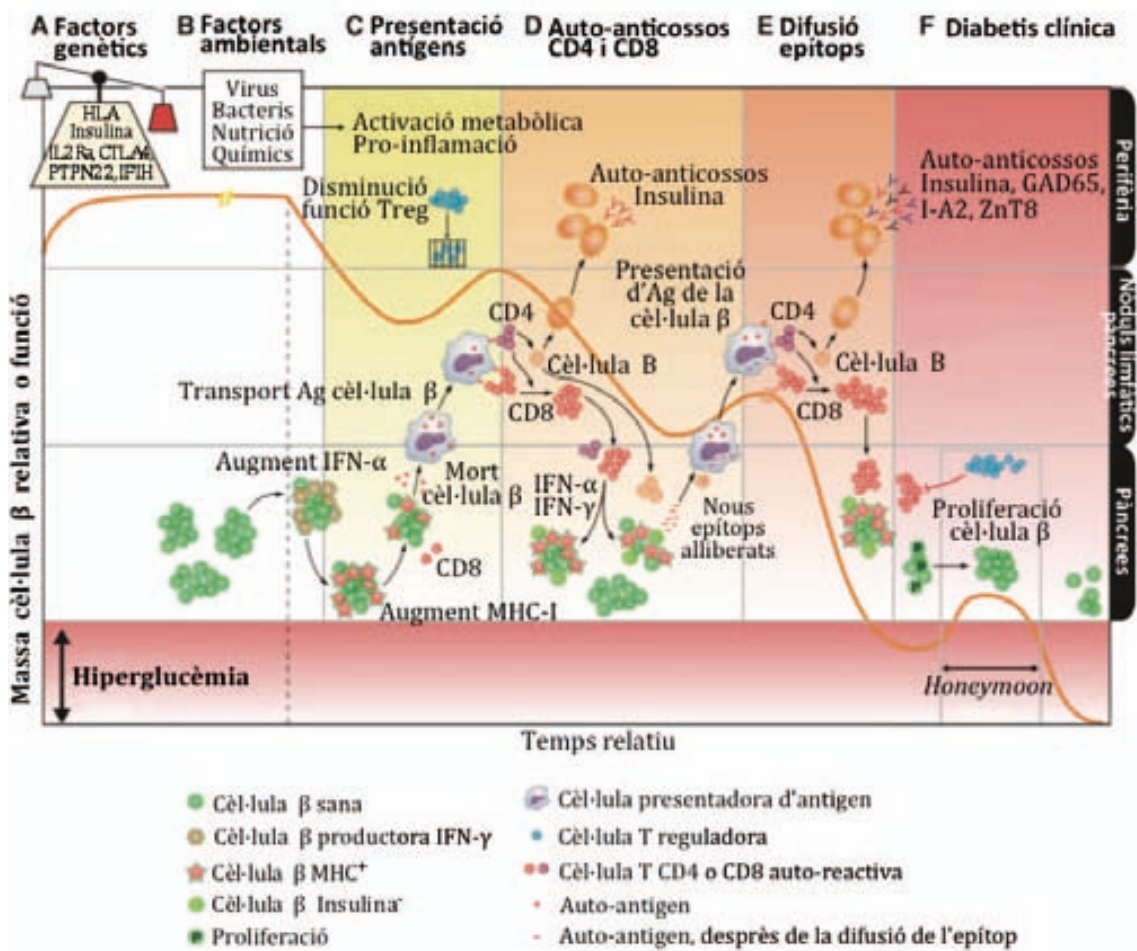
2.1. Diabetis tipus 1.

La diabetis tipus 1 (T1D) representa el 5-10 % dels pacients diabètics i en general es desenvolupa a la infància i a l'adolescència, per la qual cosa també s'anomena diabetis juvenil , encara que pot ocórrer a qualsevol edat, fins i tot en edat avançada (American Diabetes Association *et al.*, 2013). La T1D resulta d'un atac autoimmune contra les cèl·lules β del pàncrees destruïnt o danyant suficientment per disminuir i eventualment eliminar la producció d'insulina (van Belle *et al.*, 2011). L'absència d'insulina redueix la captació i utilització de glucosa pel fetge i pels teixits perifèrics, com ara el múscul i el teixit adipós, que condueix a la hiperglucèmia . A més, el fetge activa la via glucogenolítica i gluconeogènica, el que empitjora l'estat hiperglucèmic. D'altra banda, la manca d'insulina endògena causa una degradació significativa dels triglicèrids del teixit adipós, i els àcids grassos alliberats són convertits en cossos cetònics al fetge. Per tant, la manca d'insulina dóna lloc a la hiperglucèmia i la cetoacidosi, que pot acabar provocant un estat de coma i eventualment la mort del pacient.

2.1.1. Patogènia de la diabetis tipus 1.

Durant el procés autoimmune en la diabetis tipus 1 es poden diferenciar clarament dues etapes: una fase clínicament oculta (Figura 7A-E) caracteritzada per autoanticossos dirigits contra una àmplia gama d'antígens de les cèl·lules β i una elevada infiltració de limfòcits T autoreactius i altres cèl·lules inflamatòries en els illots anomenada **insulitis**; i una fase de diabetis oberta (Figura 7F) on es fa extensa la destrucció de les cèl·lules β (70-80%) provocant així una deficiència en la producció de la insulina i finalment una hiperglucèmia. (Chen *et al.*, 2005). El període de temps entre l'aparició de biomarcadors de la T1D i l'inici dels símptomes clínics és molt variable i poden passar diversos anys fins que es produeix la malaltia clínica (Harrison *et al.*, 2001). Fins que la massa de cèl·lula β no es redueix fins al 70-80% no serà diagnosticada clínicament pels nivells de glucèmia en sang elevats.

En alguns casos es pot detectar una fase temporal anomenada *Honey moon* on les cèl·lules β restants compensen la hiperglucèmia a través d'un augment de la seva proliferació i un increment en la secreció dels nivells d'insulina. Finalment, aquestes cèl·lules no tindran prou capacitat i acabaran morint, donant lloc així a una hiperglucèmia crònica (Figura 9) (van Belle *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013).



El desenvolupament de la diabetis tipus 1 (T1DM) és un procés complex que implica la interacció de factors genètics i ambientals. Els factors genètics inclouen variants d'HLA i altres gens que influeixen en la resposta immunitària. Els factors ambientals, com les infeccions víriques i bacterianes, la nutrició i els químics, poden desencadenar el procés. La presentació d'antigen i l'activació metabòlica i pro-inflamatòria són claus per a la disminució de la funció de les cèl·lules T reguladores (Treg). Aquesta disminució permet l'activació de cèl·lules T CD4 i CD8 auto-reactives que produeixen anticossos contra l'insulina i altres components de la cèl·lula β. La difusió d'epítips i la proliferació de cèl·lules β sanes són altres processos clau. El procés culmina en la diabetis clínica, caracteritzada per hiperoglucèmia i la presència d'anticossos contra l'insulina, GAD65, I-A2 i ZnT8. El període inicial de la diabetis, conegut com a "honeymoon", està caracteritzat per una relativa disminució de la hiperoglucèmia.

LITERATURA I REFERÈNCIES

No. Fu... l... nreó... A... r... h... F... Fe... r... d... qeó... r... h... h... d... Aec... t... hed... Bec... r... T... /... qeó... Fe... h... que... Ber... T... q... q... ue... c... o... Gr... ó... h... l... c... y... q... h... uer... d... ue... c... eó... ó... s... r... ó... r... b... ó... S... eó... h... d... qeó... ó... h... l... Ct... q... er... d... q... r... h... eó... d... ó... T... l... eó... se... Ber... q... h... eó... h... d... T... q... h... l... ueó... r... e... ó... Fu... A... T... Ae... T... h... F... ó... e... ó... l... o... h... d... r... h... d... h... l... ued... e... c... T... d... eó... c... eq... r... c... eó... T... à... l... d... f... q... d... ó... er... q... eó... ueó... er... à... l... d... h... c... er... u... N... z... Feó... c... o... o... T...

... h... d... q... fo... d... h... l... d... yr... q... T... a... r... eó... eó... ó... l... z... Feó... z... Fe... ueó... er... à... l... d... her... u... T... Ae... T... eó... h... l... r... yr... T... c... er... ó... h... c... Gr... h... eó... Bec... h... eó... ó... . eó... q... i... ml... i... nc... i... S... eó... l... ó... r...

NOD (*non-obese diabetic*). La utilització però, d'animals transgènics, i de models de diabetis experimental (per exemple, tractament amb Streptozotocina) han permès també posar en marxa noves vies d'estudi.

2.1.2.1. Ratolins NOD (*Non Obese Diabetic*): Models de diabetis espontanis.

Els ratolins NOD (*Non-obese Diabetic mice*) desenvolupen una diabetis sense obesitat, que és molt similar a la diabetis tipus 1 humana. En aquests ratolins, només desenvolupen diabetis oberta aproximadament el 80% de les femelles i el 20% dels mascles (Makino *et al.*, 1980) i, aquesta incidència és variable en funció de les condicions ambientals. Els símptomes apareixen aproximadament a les 12-14 setmanes i són: hipoinsulinèmia, hiperglucèmia i glucosúria.

2.1.2.2. Models induïts experimentalment:

A) Models d'animals transgènics.

Amb l'objectiu d'estudiar el paper de les diferents citoquines del sistema immune, s'han generat diversos animals transgènics com a models de diabetis mitjançant l'expressió d'aquestes citoquines específicament a les cèl·lules β dels illots sota el control del promotor del gen de la insulina de rata (RIP).

Els animals transgènics que expressen **IFN- γ** (Interferó γ) a les cèl·lules β pancreàtiques desenvolupen diabetis com a resultat d'una progressiva destrucció dels illots pancreàtics, causada per la infiltració limfocitària i un increment de l'expressió de MHC de classe II (Krakowski *et al.*, 2000; Sarvetnick *et al.*, 1990). Els ratolins transgènics que expressen **IFN- β** (Interferó β) a les cèl·lules β presenten característiques d'un estat pre-diabètic, hiperglucèmia, hipoinsulinèmia, hipertrigliceridèmia, i el test de tolerància a la glucosa alterada. Tot i que presenten infiltració limfocitària als illots i una diabetis clínica quan eren tractats amb dosis baixes de streptozotocina (STZ) (Alba *et al.*, 2004; Casellas *et al.*, 2006; Pelegrin *et al.*, 1998).

L'expressió transgènica de **TNF- α** (*Tumor Necrosis Factor α*) en les cèl·lules β provoca una severa inflamació sense una disminució del contingut d'insulina dels illots ni diabetis. Per tant, la inflamació causada per l'expressió de TNF- α no és diabetogènica (Picarella *et al.*, 1993).

Els ratolins transgènics que expressen **IL-6** (Interleucina 6) sota el control del promotor RIP presenten insulitis i illots hiperplàsics i desorganitzats. Així, la IL-6 indueix el reclutament i la diferenciació de cèl·lules B en cèl·lules plasmàtiques, però la seva sobreexpressió als illots no condueix a la diabetis (Campbell *et al.*, 1994).

L'expressió de **MCP-1** (*Monocyte chemoattractant protein-1*) específicament a les cèl·lules β indueix insulitis però sense desenvolupament de diabetis. Per tant, la infiltració de macròfags als illots no és suficient per induir la destrucció de les cèl·lules β (Grewal *et al.*, 1997).

B) Models induïts amb agents químics

Existeixen diversos agents químics amb propietats diabetogèniques com l'estreptozotocina (STZ) i l'al·loxan. Ambdós tòxics són específics de la cèl·lula β . La seva efectivitat com agents diabetogènics depèn en gran part de l'edat, sexe i espècie a la qual s'injecta. Aquests agents han permès estudiar detalladament els successos bioquímics, hormonals i morfològics que tenen lloc durant i després de la inducció de l'estat diabètic.

L'estreptozotocina (STZ), 2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)1-Ddlicopiranos, és un antibiòtic d'ampli espectre produït pel microorganisme *Streptomyces achromogenes*, que entra específicament a les cèl·lules β a través exclusivament pel transportador de membrana de la glucosa, GLUT-2, donada la seva similitud estructural amb la molècula de glucosa (Schneidl *et al.*, 1994). La inducció de la mort de les cèl·lules β per aquest tòxic ve donada per diferents mecanismes: 1) danys a la membrana plasmàtica, 2) trencament de les cadenes de DNA, 3) processos de metilació, 4) generació de radicals lliures, i 5) producció d'òxid nítric (NO). Aquests processos donen lloc a l'activació de l'enzim poly(ADP-ribosa) sintasa i al consegüent exhauriment de les reserves cel·lulars de NAD⁺. Provocant la subseqüent cessació del metabolisme proteic depenent d'aquest metabòlit, i per últim la mort de la cèl·lula (Wilson *et al.*, 1984). La generació de radicals lliures i productes com el superòxid i l'òxid nítric provocarien també la mort per apoptosi d'aquestes cèl·lules (Bedoya *et al.*, 1996; Konrad *et al.*, 2001).

El protocol d'administració de la STZ en determina el mecanisme d'acció. Així, l'administració d'una única dosi intraperitoneal d'elevada concentració de STZ (150 mg/kg) provoca la destrucció ràpida de les cèl·lules β per acció citotòxica directa, donant una pèrdua del 90% del contingut pancreàtic d'insulina i, per tant, hiperglucèmia. Alternativament, es poden administrar múltiples dosis a baixa concentració de STZ (40-50

mg/kg en una injecció durant 5 dies consecutius). Aquest mètode es coneix com *multiple low dose streptozotocin* o MLDSTZ. En aquest cas, es redueix l'efecte citotòxic directe de la STZ, però s'indueix una resposta inflamatòria contra les cèl·lules β , amb infiltració limfocitària (insulitis). No obstant, la susceptibilitat a desenvolupar insulitis i hiperglucèmia mitjançant aquest mètode es veu influenciat per l'edat, el sexe i la soca dels ratolins. Així, la soca C57Bl/Ksj i la colònia CD1 amb una dosi de 40 mg/kg presenten una major predisposició a desenvolupar insulitis que les soques BALB/c, C57Bl6/SJL i DBA/2J (Rossini *et al.*, 1977)

Per altra banda, l'**al.loxà** (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) va ser descrit per primera vegada per Bugnatelli el 1818 però no van ser descrites les seves propietats diabetogèniques fins el 1943. Presenta dos efectes patològics diferents que interfereixen en la funcionalitat de la cèl·lula β . Inhibeix la secreció d'insulina induïda per la glucosa a través de la seva capacitat d'inhibir específicament la glucoquinasa, el sensor de glucosa de la cèl·lula β . En segon lloc causa una necrosi de les cèl·lules degut a la producció de radicals lliures (Szkudelski *et al.*, 2001)

La dosi per induir un estat diabètic depèn de l'espècie, la ruta d'administració i l'estat nutricional. Per exemple els illots humans són més resistents als efectes de l'al.loxà que les rates i ratolins (Eizirik *et al.*, 1994).

2.2. Tractaments actuals per a la diabetis tipus 1.

Els tractaments actuals per a pacients amb diabetis tipus 1 inclouen teràpies de reemplaçament d'insulina convencional, per injecció o mitjançant l'ús de bombes, que redueixen la glucosa en sang, però no es dirigeixen a revertir la disminució de la massa β cèl·lules dels pacients. A més, aquests tractaments no prevenen el desenvolupament de complicacions secundàries a llarg termini derivades de la hiperglucèmia crònica i els pacients també estan exposats a episodis d'hipoglucèmia, potencialment mortals. Per tal de superar aquests inconvenients, s'ha posat molta cura a la millora dels sistemes tancats anomenats "pàncrees artificial" (Keenan *et al.*, 2010) on contínuament un sensor col·locat just sota la pell, mesura els nivells de glucosa en sang i a través d'una bomba d'insulina amb una agulla fina implantada sota la pell allibera la insulina adequada (Dolgin *et al.*, 2012).

El transplantament de pàncrees o d'illots són possibles aproximacions terapèutiques per a la diabetis tipus 1 ja que proporcionen una font endògena d'insulina

fiològicament regulada. No obstant, l'escassetat de donants, el rebuig immunològic i la necessitat de la immunosupressió fa que aquestes teràpies estiguin limitades (Jahansouz *et al.*, 2011).

Per altra banda, donada la etiologia de la diabetis tipus 1, existeixen teràpies basades en immunomoduladors els quals retardarien l'inici de la diabetis tipus 1 i/o protegirien a les cèl·lules β residuals de l'atac autoimmune i així mantenir la producció d'insulina endògena. La limitada eficàcia dels primers immunomoduladors va estimular als investigadors a buscar noves estratègies més específiques que afectessin als mecanismes precisos de la destrucció de les cèl·lules β . Existeixen anticossos anti-CD3 els quals redueixen el nombre de limfòcits T circulants. Tot i que els assajos clínics en fase III d'aquests anticossos monoclonals no van obtenir els objectius inicials esperats (Sherry *et al.*, 2011; Waldron-Lynch *et al.*, 2011). Un altre anticòs anti-CD20, anticòs contra els limfòcits B estan sent provats en individus diabètics (Waldron-Lynch *et al.*, 2011). Després d'un any del tractament amb anti-CD20 els pacients presentaven una millor funcionalitat de la cèl·lula β i mostraven menor dosis d'insulina respecte els controls els primers 6 mesos, però posteriorment els individus tractats acabaven perdent la massa de cèl·lula β (Lysy *et al.*, 2012; Waldron-Lynch *et al.*, 2011). Existeixen altres immunomoduladors contra la IL-1 β i CTLA-4.

Un altre camp on s'estan desenvolupant molts estudis són els relacionats amb les cèl·lules mare embrionàries (ESC, *Embryonic Stem Cells*) i les cèl·lules pluripotencials induïdes (iPS). Les quals a partir de diferents estratègies es poden diferenciar o reprogramar en cèl·lules productores d'insulina i en un futur ser una possible teràpia cel·lular per a la diabetis tipus 1. Actualment, s'ha aconseguit reprogramar fibroblasts adults provinents de pacients diabètics inserint només tres factors de transcripció, Oct-4, Sox2 i Klf4. (Maehr *et al.*, 2009). I aquestes poden derivar cap a cèl·lules productores d'insulina (Pagliuca *et al.*, 2013). Hi ha múltiples grups que estan avançant cap a la diferenciació de ESC i de iPS cap a cèl·lules Pdx⁺ capaces de produir insulina o secretar pèptid C (Soria *et al.*, 2000; Thatava *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009a). No obstant, el repte més important en la reprogramació cel·lular es aconseguir una bona diferenciació de les cèl·lules β de forma que puguin produir la insulina d'una manera finament regulada.

A més a més, encara falten estudis per avaluar els riscos immunes del transplantament de cèl·lules derivades de ESC o iPS.

3. TERÀPIA GÈNICA.

Tot i que els tractaments existents tant en la diabetis tipus 1 com en la diabetis tipus 2 han millorat la qualitat de vida dels pacients, aquestes teràpies no han aconseguit curar la malaltia. El disseny de noves teràpies per a la diabetis requereix en primer lloc avançar en el coneixement dels mecanismes moleculars que desencadenen la malaltia. En aquest sentit, la transferència de gens al pàncrees mitjançant vectors pot oferir un gran potencial per aprofundir en el coneixement de la patogènia de la diabetis així com també pot ser utilitzat per desenvolupar nous tractaments contra la malaltia.

3.1. Introducció a la teràpia gènica.

La teràpia gènica es basa en la transferència de material genètic exogen (DNA o RNA) a les cèl·lules o teixits, amb la finalitat de corregir o alleujar els símptomes d'una malaltia. Aquestes cèl·lules transduïdes sintetitzaran la proteïna terapèutica. A través d'aquesta metodologia es poden aconseguir nivells estables de la proteïna terapèutica mitjançant una única injecció del vector que conté el gen terapèutic d'interès. Es tracta d'una teràpia somàtica, és a dir, no modifica la línia germinal.

En un principi es va considerar la teràpia gènica com a una eina bàsica per al tractament de malalties hereditàries monogèniques amb l'objectiu de tornar-li a administrar a la cèl·lula la capacitat de produir la proteïna del gen mutat tot i sent actualment una estratègia àmpliament validada per aquest tipus de malalties. Tot i així, la majoria de les aplicacions en teràpia gènica s'estan desenvolupant per a malalties d'una elevada prevalença tant poligèniques com hereditàries. Així doncs, tant la diabetis tipus 1 com la tipus 2 poden ser considerades com a bones candidates per ser tractades amb estratègies de teràpia gènica.

El material genètic exogen administrat pot tenir diferents finalitats; per afegir còpies correctes de gens mutats absents, per augmentar la dosi de gens (DelloRusso *et al.*, 2002), corregir els gens deficients (Haurigot *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; Ruzo *et al.*, 2012) o fins i tot per silenciar l'expressió de determinats gens (Aoki *et al.*, 2003).

Existeixen dues aproximacions de teràpia gènica: la **teràpia gènica *ex vivo***, on les cèl·lules del teixit a modificar s'obtenen per biòpsia, es cultiven *in vitro*, es modifiquen genèticament i es transplanten de nou a l'individu; i la **teràpia gènica *in vivo*** les cèl·lules són modificades genèticament *in situ* mitjançant els vectors de transferència gènica.

Un dels factors clau en l'èxit de la teràpia gènica és el desenvolupament de **vectors** que siguin eficients a l'hora de transferir el material genètic al teixit o teixits diana sense causar cap efecte patològic extra. En general aquests vectors es classifiquen en dos grans categories: els virals i els no virals (Kay *et al.*, 2011).

Els sistemes de transferència amb **vectors no virals** inclouen la injecció directa de DNA mitjançant mètodes físics (electroporació, sonicació), o bé l'encapsidació del DNA amb liposomes (lípidis catiónics o polímers cationics) per introduir el material genètic a la cèl·lula diana. Els **vectors virals** utilitzen la capacitat dels virus per entrar a la cèl·lula, transferir el DNA al nucli i expressar les proteïnes. Una vegada transferit el material genètic, el producte del nou gen terapèutic pot actuar sobre la pròpia cèl·lula, sobre les cèl·lules veïnes o entrar a la circulació sanguínia per actuar a les cèl·lules més llunyanes.

3.2. Vectors virals

Els vectors virals són virus modificats de manera que al infectar la cèl·lula generen una infecció abortiva. En aquest cas, la càpside vírica conté un genoma que ha estat modificat genèticament per tal de que mantingui la capacitat d'infectar la cèl·lula i introduir el material genètic, però sense poder-se replicar i produir nous virus recombinants. A més, l'eliminació d'aquests gens virals en el genoma s'aprofita per generar major capacitat de clonatge pel casset terapèutic (Kay *et al.*, 2001). En teràpia gènica es coneix aquest fenomen com a **transducció**, a diferència del terme infecció, utilitzat en virologia per descriure l'entrada del virus salvatge a la cèl·lula i la inherent replicació del mateix.

Per tal que la teràpia gènica resulti exitosa cal administrar una dosi adequada del gen terapèutic en el teixit diana sense causar toxicitat. No obstant, s'han de vèncer determinades barreres que poden limitar l'eficàcia (Kay *et al.*, 2011). Existeixen principalment quatre barreres:

- 1) L'entrada del vector, el transport i l'alliberament de la càpside. Quan un vector es administrat a l'individu a un teixit localitzat (injecció directa al teixit, per exemple injecció intraductal al pàncrees) o per via sistèmica (injecció intravenosa) ha de ser absorbit pel teixit diana, entrada a la cèl·lula i transport del material genètic fins al nucli i permetre nivells terapèutics de l'expressió del transgèn. La distribució del vector després de l'administració es pot veure afectada per molts paràmetres com les

barreres endotelials del teixit diana, la mida del vector i les interaccions entre el lligand del vector i els receptors de la cèl·lula hoste.

- 2) Persistència del vector. En el cas dels vectors no integratius, la molècula de DNA exògena activa pot existir com a episomal, la qual es perd durant la divisió cel·lular. No obstant, els vectors episomals poden persistir llargs períodes en els rosegadors i durant molts anys en els animals més grans si son administrats en teixits amb baixa taxa de replicació o cèl·lules quiescents com el fetge, cervell, cor, múscul o pàncrees. En canvi, els vectors integratius s' integren al genoma de la cèl·lula hoste de manera que es poden transmetre a totes les cèl·lules si es divideixen.
- 3) Expressió sostinguda del transgèn. L'objectiu de la teràpia gènica es que la durada de l'expressió del transgèn ha de coincidir amb el període de temps requerit per al tractament de la malaltia. No obstant, en algunes circumstancies el transgèn expressat pel vector viral pot ser extingit per modificacions epigenètiques, com per exemple metilacions del DNA o de les histones.
- 4) Resposta immune. Una de les barreres que més influencia en l'eficàcia de la teràpia gènica és l'activació de la resposta immune de l'hoste que pot ser dirigit a la contra el producte del transgèn i/o contra les partícules de la càpside del vector (Kay *et al.*, 2011; Mingozi *et al.*, 2013a; Mingozi *et al.*, 2013b).

Durant els últims anys, diferents tipus de vectors presents a la natura s'han modificat per ser utilitzats en teràpia gènica (Taula 1).

Taula1. Característiques generals dels vectors virals.

Vector	Avantatges	Desavantatges
Adenovirus (Ad)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada capacitat de clonatge ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ Roman episomal ▪ Elevats nivells d'expressió del transgèn <i>in vivo</i> ▪ Útils en experiments de curta durada 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Provoca resposta inflamatòria degut a la capacitat immunològica ▪ Tropicisme inespecífic ▪ Alta toxicitat hepàtica
Virus adenoassociats (AAV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada estabilitat en cèl·lules específiques ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ Roman episomal ▪ Producció amb elevats títols ▪ Baixa immunogenicitat ▪ No patogènic ▪ Àmplia varietat de serotips amb diferents tropismes específics de teixits ▪ Elevada estabilitat en línies cel·lulars 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixa capacitat de clonatge (4.8 kb)
Retrovirus (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expressió estable en cèl·lules en divisió ▪ Producció amb elevats títols ▪ Possible re-administració 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Integració a l'atzar al genoma de l'hoste amb el risc de mutagènesi insercional ▪ Baixa capacitat de clonatge (8 kb) ▪ Infecta només cèl·lules en divisió
Lentivirus (LV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ Expressió estable a llarg termini ▪ No immunogènic 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Integració a l'atzar al genoma de l'hoste amb el risc de mutagènesi insercional ▪ Es necessiten més estudis per avaluar la manca de patogenicitat
Virus Herpes símplex (HSV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ Roman episomal ▪ Elevada capacitat de clonatge (50 kb) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expressió transitòria ▪ Neurotoxicitat poc caracteritzada

Adaptació de (Kay *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2005).

3.3. Vectors virals adeno-associats.

Els vectors virals basats en els virus adeno-associats (AAV) són una eina per a la teràpia gènica. Existeixen nombrosos estudis on es demostra la baixa resposta immune en els models animals, així com la seva expressió en teixits amb baixa taxa de replicació com el fetge, el cor, el cervell, etc... la qual pot arribar a durar fins i tot anys (Mingozzi *et al.*, 2011; *et al.*, 2013b). No obstant, s'han detectat respostes immunitàries febles en alguns

assajos clínics en humans que aparentment es poden controlar amb una lleu immunosupressió (Nathwani *et al.*, 2011).

3.3.1. Biologia dels AAVs.

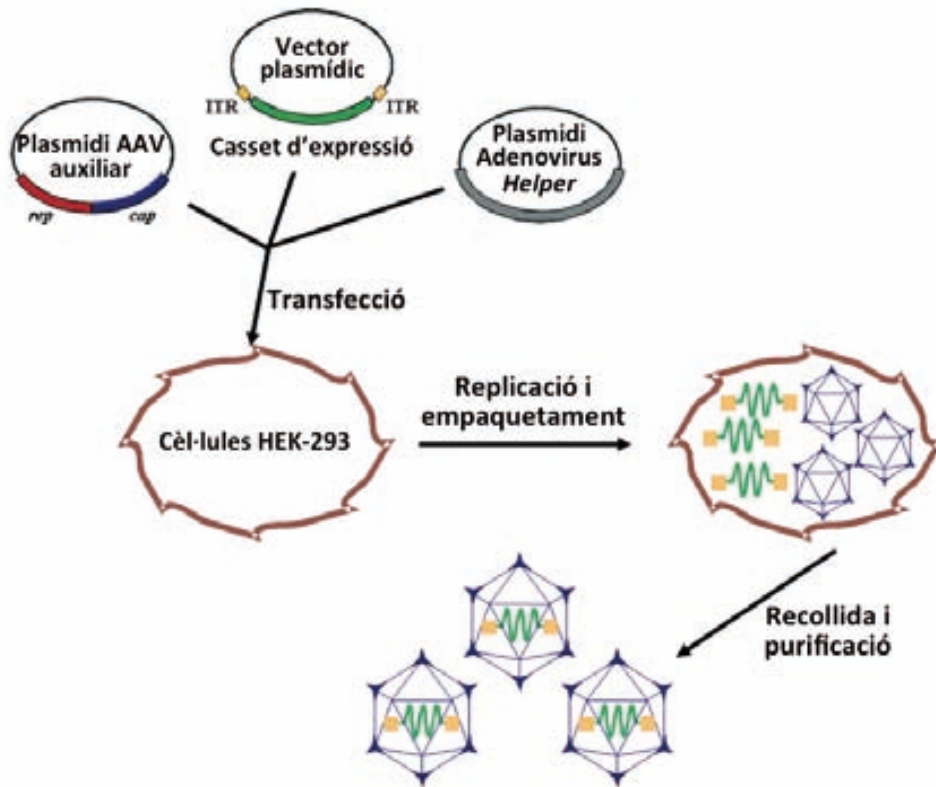
Els virus adenoassociats (AAV), un tipus de virus de DNA monocadena (ssDNA) pertanyent al gènere Dependovirus de la família *Parvoviridae*. Aquesta classificació es basa en el fet que els AAV depenen de la coinfecció d'un virus *helper* no relacionat (per exemple adenovirus, el virus de l'herpes, el citomegalovirus humà, o el virus del papil·loma) per a la infecció productiva. Els AAV mai s'ha demostrat que puguin causar cap malaltia en humans. Fins a l'actualitat existeixen 14 serotips i més de 100 variants aïllades com a contaminants de les preparacions adenovirals i de les seqüències provirals integrades que es trobaven en els primats no humans i teixits humans (Buning *et al.*, 2008). Però només uns quants s'han utilitzat com a vectors i estudiat amb més profunditat (Kay *et al.*, 2011). Tots els serotips dels AAV comparteixen una estructura semblant, la mida del genoma i l'organització, sent el AAV5 el serotip més divergent (Qiu *et al.*, 2004).

Els AAV són virus amb una càpside icosaèdrica sense envolta d'un tamany de 20 a 25 nm de diàmetre i amb un genoma de DNA monocatenari (ssDNA) d'unes 4.7 kb. Al genoma dels AAV es poden identificar tres regions funcionals importants (Figura 8): dues pautes de lectura obertes (ORF) anomenats *rep* i *cap* i les repeticions terminals invertides (ITR) (Carter *et al.*, 2000).

Les ITRs formen unes estructures en forma de T a l'extrem 5' i 3' del genoma del AAV com a origen de replicació i tenen un paper clau en la integració del genoma viral en el genoma de l'hoste així com la posterior recuperació del DNA viral des de l'estat integrat.

La pauta de lectura *rep* codifica per quatre proteïnes multifuncionals (REP) implicades en la replicació del genoma viral, en el control de la transcripció, en la integració i en l'encapsidació dels genomes dels AAV en càpsides preformades. L'AAV té una tendència a integrar-se en una regió específica del cromosoma 19 humà anomenada AAV-S1 (Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991). El mecanisme d'integració pot implicar la proteïna Rep68 (Weitzman *et al.*, 1994).

La pauta de lectura *cap* codifica per a tres proteïnes de la càpside VP1, VP2 i VP3 les quals tenen en comú la major part de les seves seqüències d'aminoàcids excepte l'extrem N-terminal. Les diferències de les proteïnes de la càpside dels diferents serotips



El procés de producció d'adenovirus utilitza tres plasmidius: un plasmidi auxiliar AAV (amb regions *ngf* i *cap*), un vector plasmidic amb regions *ITR* i un casset d'expressió, i un plasmidi helper d'adenovirus. Aquests plasmidius s'introdueixen a les cèl·lules HEK-293 mitjançant transfecció. Les cèl·lules realitzen la replicació i empaquetament dels virus, produint partícules d'adenovirus. Finalment, es realitza la recollida i purificació dels virus.

2

El procés de producció d'adenovirus utilitza tres plasmidius: un plasmidi auxiliar AAV (amb regions *ngf* i *cap*), un vector plasmidic amb regions *ITR* i un casset d'expressió, i un plasmidi helper d'adenovirus. Aquests plasmidius s'introdueixen a les cèl·lules HEK-293 mitjançant transfecció. Les cèl·lules realitzen la replicació i empaquetament dels virus, produint partícules d'adenovirus. Finalment, es realitza la recollida i purificació dels virus.

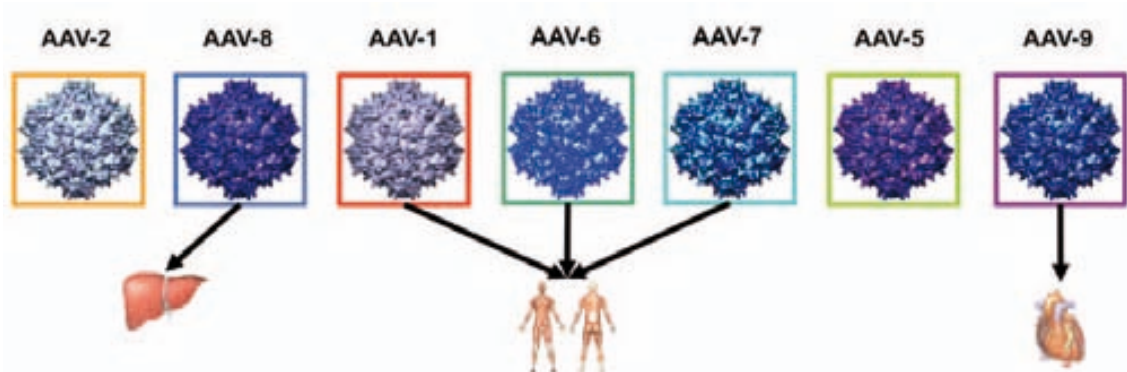
El procés de producció d'adenovirus utilitza tres plasmidius: un plasmidi auxiliar AAV (amb regions *ngf* i *cap*), un vector plasmidic amb regions *ITR* i un casset d'expressió, i un plasmidi helper d'adenovirus. Aquests plasmidius s'introdueixen a les cèl·lules HEK-293 mitjançant transfecció. Les cèl·lules realitzen la replicació i empaquetament dels virus, produint partícules d'adenovirus. Finalment, es realitza la recollida i purificació dels virus.

2

ql c h d qGueeóSqr qeóue d r óuFqGueóuBeder. óedl. Thóer óeB Tr sFnr qT uee
eó222ó2r Theoí óe. uNBhdeóG,

? ? à de. .ueedl. Thóue2222uBedeBer er eóThFóue22qeh. l dz FeF. TTer hed2
er. d d2 b 2qnoóFo 2uTr 22er 2eó2ehgl hó2Feó2l r 2deql retF. óhed2óB.ec 2E c FrT d22
2NzFeó. 2c red 2er 2sFr qG2ue2. ThFó2qeóóFo d2 2eBT2uTr 2zFe2eó2àFct F2 d2IA d22
deSqr qT uee d r óuFqGueeóeFdy2 oed u 2betl r óe2 ThFóue2hd. eM 2eó.dFq. Fd dz Fe2
ql rsl dc 2ó 2yhóue2ue2eql d2A 22Fr T t 2cp2288-S,

? 2B.eBer 2eó. Fu22l r 2óNà 2 2deSqr qT uee d r óuFqG 2ó. eBTóóetl r óe2
óedl. Theeó222, 2l. 22Fe2A 2a 2uBedr qeóer 2eó. Fu22net F. 2ó 2óer b22 2ó2 n. l ueóue2
ue. eqqG2ueó2uBeder. ó2óedl. Thóó 2 Fr 2óedl. Thó2. er er 2Fr 2h d. 2Fo d2. dl h2c e2hed2
ue. edc Tr . ó2eBTó, 2ed2Bec h2e2eó222- 2e2e. te2eó22292222À222227 2hed2 è2qF2
eóz Fem. 2e2222Khed2l d22Fr T t 2cp2288-S,



? 2AGD2522GÍ C FQ RARFA TRGRUVFRGÍ VCFARF2222GRPÍ Q E UDM22etl r óe2hd. eMeóue2 2yhóue2ue2
2222 zFeó. ó2àTFó2. Tr ud r 2Fr 2d h2c e2hdse2er qT 2q h2 ue. edc Tr . ó2. eBTóóetl r óe22deqeh. l d2ue2
óFhed2ue2 2noóFo 2al óe. 2. te2u h. u ue22 Tr t l EE2cp2289/AS,

?
? 2l r qde. c er. 2r 2e2222ueedl. ThK2N 2 Aóedà . 2Fe2zFeó. 2 2 í ó2 2 í ó2hed2l d2
. c Aí 2hl. 2d r óuF2e2e2e2e2 Fd2l. 2 cp2289/ 22FE 2 cp2289S2e2h r qde2c A2
c il 2eSqr qT 2eó2noóFo 2e2Bl qdF e222 er l d2 2eóer ul qdF eóer 2l c h d qG2c A2e2
2222À2222- 22c er e22 cp2289S2e2 deBT2uThG2 r. 2 2A o r q2l c 2 2t ddG22c er e22c2
2289/S,

?

?

?

?

3.4. Vectors Adenovirals.

Es coneixen més de 100 membres de la família Adenoviridae capaços d'infectar l'home i un gran nombre de diferents espècies d'animals. Els Adenovirus humans son els responsables d'un 5-10% de les malalties respiratòries agudes en els nens i un nombre variable de conjuntivitis i gastroenteritis.

El tropisme natural dels Adenovirus és l'epiteli respiratori i la conjuntiva degut principalment per la seva manera de transmissió enlloc de les característiques moleculars del virus. El receptor (*Coxsackie Adenovirus Receptor*, CAR) que s'expressa de forma ubiqua, permet la infecció a les cèl·lules, de manera que la majoria de tipus cel·lulars pot dur a terme la replicació adenoviral independentment de l'estat replicatiu de les cèl·lules diana (Law *et al.*, 2005). Una altra propietat addicional dels adenovirus és la gran eficiència amb la que utilitzen la maquinària cel·lular per a la síntesi del mRNA viral i la conseqüent traducció de les proteïnes virals.

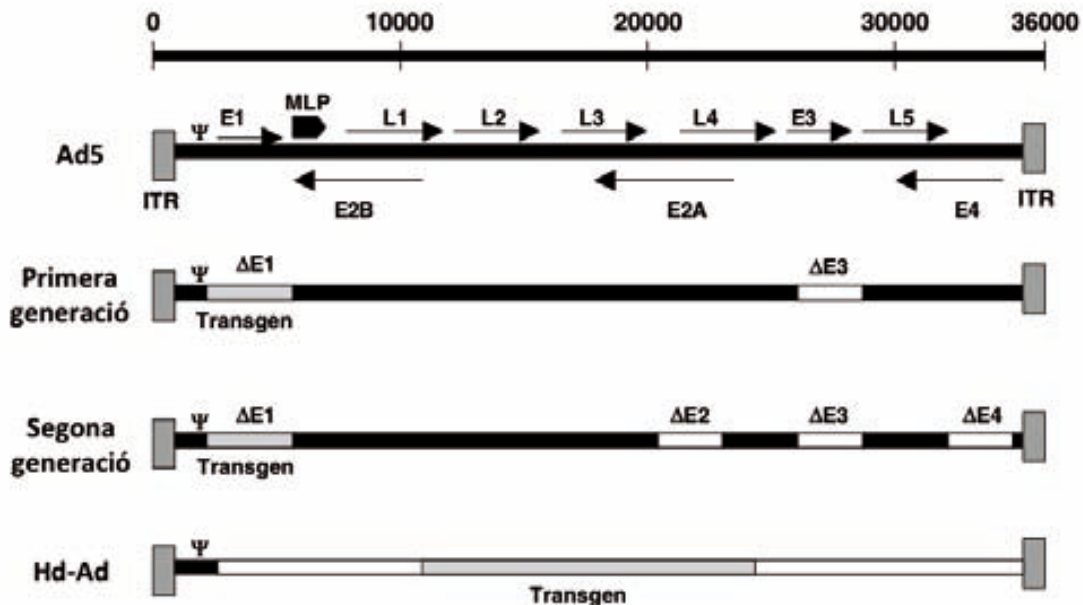
3.4.1. Biologia dels Adenovirus.

Es poden distingir més de 50 serotips capaços d'infectar als éssers humans classificats en 6 subgrups (A-F) segons la capacitat dels sèrums humans en el procés de l'aglutinació, neutralització de la infecció adenoviral de les cèl·lules vermelles de la sang. La majoria dels vectors utilitzats en teràpia gènica deriven dels serotips 2 i 5 (Ad2, Ad5) del subgrup C (Giacca *et al.*, 2012; Kay *et al.*, 2011).

Els Adenovirus són partícules icosaèdriques sense envolta de 60 a 90 nm de diàmetre i amb un genoma a l'interior de doble cadena de DNA lineal (dsDNA) de 36 kb. Al genoma dels Adenovirus es poden diferenciar a cada extrem les anomenades ITR (*Inverted Terminal Repeat*) d'unes 100 a 140 pb i una senyal d'empaquetament (Ψ) formada per set repeticions situades a 5' del genoma. Aquest genoma codifica per dos tipus de gens: gens primerencs (*Early gens*, E), els quals són necessaris per la síntesi de proteïnes que intervenen en la replicació del DNA de la cèl·lula i en segon lloc hi ha els *Late gens* o gens tardans, necessaris per l'encapsidació ja que codifiquen per proteïnes estructurals i altres proteïnes implicades en l'assemblatge del virió. Les principals proteïnes estructurals de la càpside són: la Fibra (responsable de l'acoblament inicial del virions a la superfície cel·lular), la proteïna base pentona (s'uneix a les integrines de la cèl·lula) i la proteïna hexó (majoritària), totes elles determinen el tropisme del virus. La primera unitat de transcripció viral que s'expressa és E1A. La lisi cel·lular i l'alliberament dels virions

ó f q e e B h d l B E u c e r . 7 8 a l d e o ú e ó n d i ó ú e ó d e r s e q q T G A 2 7 6 8 8 1 a l d e d o c 7 6 6 8 8 : S ,

ú o ú u e r l à T F ó a r e ó . e r T h F o . ó T e r n . T q c e r . e h e d e ú e ó e d F . T E . ó ú l c ú à e q l d ó e r e d y h T i n r T q , e t l r ó d e r T h F o q T e r n . T q e ó a e q l d ó u e r l à T d ó ú ó h l u e r q o ó s T q d e r e a e q l d ó u e h d e d e d e t l r e r e d q T e h e r u e r . ó u e s p i e d e q d e t e r e d q T F d : S ,



M A G d f x D C D A R O M R U Í Q D A R I E A u I R F A T R G R U V F M R U R G D P Í U F A R C F E R P Í G F D A R U Í È G D F x e o t e t T r ó u e o t e r ó h d e e d e r q ó G r e h e d e o e r . ó h e d 2 9 x 2 : 2 2 e o t e r ó d u r ó h e d 2 9 x 2 1 , 2 2 u 1 - 2 2 u e r l à T F ó l e 2 2 u 2 u 2 u e r l à T F ó a : p i u e h e r e r . e 2 2 - 2 2 i l d o . e h d c l . e d 2 2 P S e r b a n c h z F e . c e r . , 2 2 T F d 2 u h . u a e 2 2 " 2 2 A 2 2 c 7 6 8 8 1 S ,

?

ú e . d . n t T u e o ú a e q l d ó e A R U Í È G D F A R C G Q R G D M R U R G D P d " 2 2 2 u 2 2 m n c 2 2 r i 2 2 c m r 2 2 2 2 r , . m d n S í ó e o d e e c h o p c e r . u e 2 2 o 2 2 d e t T G 2 2 9 2 2 h e d . d r ó t n r 2 2 u n f . e d n ó 2 2 h d l à l q r . F r T q h q T . e y B e ú e h d r . t e u e 2 2 D A 2 2 7 2 2 F ó e a 2 2 c 7 6 8 8 K S 2 2 e à T r . 2 2 F e 2 2 e o a T F ó e ó h f t T e h o q d 2 2 r . a T r e 2 2 c 7 6 8 8 S , 2 2 e h d r q h d h d A e c 2 2 u n z F e ó . ó 2 2 d ó . T F o q T e o 2 2 t . e c 2 2 c F r e 2 2 h e d 2 2 n q . a q T e o 2 2 c s C q T ó 2 2 2 2 T l . C B t ó 2 2 u e t F . 2 2 F e 2 2 c r . e r e r 2 2 e o e F e r l c 2 2 e i l d T u e o 2 2 e r ó a T d ó 2 2 h e d 2 2 r . 2 2 e a 2 2 e B h d e o 2 2 T G í ó 2 2 . e c h l d 2 2 e r 2 2 r T e ó 2 2 c F r l q l c h e . e r . ó 2 2 2 e o 2 2 2 c 7 6 8 8 : 2 2 a T c F o e 2 2 c 7 6 8 9 K K K e 2 2 r . a T r e 2 2 c 7 6 8 8 2 2 T F c 7 6 8 8 / 2 2 q 2 2 s d e b 2 2 c 7 6 8 8 - 2 2 r t 2 2 c 7 6 8 9 K K : S , 2 2 e d 2 2 a e 2 2 h d e a e r T d z F e ó . 2 2 e ó h l ó . 2 2 c F r e 2 2 e ó a r u e o e r à l d h d e o 2 2 a e q l d ó e A R U Í È G D F A R C F R M U D M R U R G D P d , 2 2 r z F e ó . a e q l d ó e 2 2 í ú e ó d e t T G 2 2 9 2 2 n r e o t T . 2 2 e o d e t T r ó 2 2 6 2 2 : e h e d 2 2 r . 2 2 e r e r 2 2 i l d a h q T . e h e d 2 2 e r ó e d q T e u e d r ó t n r ó 2 2 s T ó 2 2 : 2 2 D A S 2 2 e r l d 2 2 d e ó h l ó . 2 2 c F r T y d T 2 2 F e ó a e h d e d e r e d q T , 2 2 e d C n f q l r à e r T e r . 2 2 F e 2 2 e r e r 2 2 z F e ó . ó 2 2

?

vectors és la necessitat de línies cel·lulars capaces d'expressar totes les funcions que manquen per tal de completar el cicle lític (Wang *et al.*, 1996). Els vectors **Adenovirals dependents de helper** (HdAd), o també anomenats de tercera generació, *gutless* o d'elevada capacitat van suposar un gran avenç en la seguretat i l'eficàcia ja que totes les seves seqüències virals codificants han estat eliminades (Alba *et al.*, 2005; Brunetti-Pierri *et al.*, 2008).

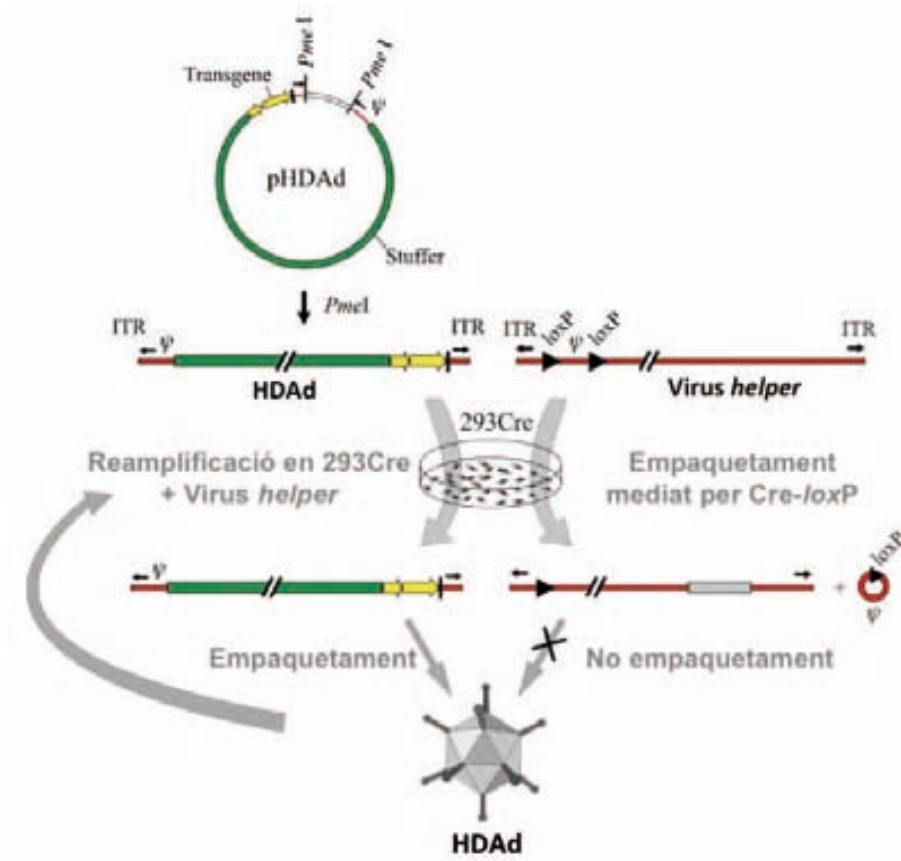
3.4.2. Vectors Adenovirals helper dependents (HdAd).

Un dels problemes més importants dels vectors adenovirals de primera i segona generació és la resposta immune que desencadenen en els animals immunocompetents. Amb l'eliminació de tots els gens virals es va aconseguir que aquesta resposta immune es reduís considerablement donant lloc als Adenovirus de tercera generació, *helper dependents* (HdAd) que permeten una major capacitat de clonatge (fins a 35 kb) (Palmer *et al.*, 2005).

L'eliminació de tots els gens virals permet l'expressió del transgèn a llarg termini en absència de toxicitat crònica (McCaffrey *et al.*, 2008). Altres avantatges dels vectors adenovirals són l'absència de transmissió a la línia germinal i de mutagènesi insercional ja que el genoma roman de forma episomal. Cal destacar que aquests virus no es poden replicar, són capaços de transduir les cèl·lules però no poden replicar-se i infectar noves cèl·lules. Les úniques seqüències virals que romanen en els HdAd són les ITRs i la senyal d'empaquetament (Ψ) (Giacca *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2005).

Donada les propietats dels HdAd, la producció d'aquests vectors virals és molt més complexa obtenint-se uns títols menors respecte els Adeno-associats. Per a la producció es necessita primer de tot un Adenovirus de primera generació (FGAd) que actua com a virus auxiliar anomenat virus *helper* ($\Delta E1$) el qual presenta la senyal d'empaquetament flanquejada per les seqüències *loxP*. En segon lloc es necessita una línia cel·lular que expressi la recombinasa Cre i el gen E1, com la línia cel·lular 116 Cre derivades de les cèl·lules 293 però amb elevada expressió de la Cre (Figura 15) (Palmer *et al.*, 2003; Palmer *et al.*, 2008). La combinació de virus auxiliar i les cèl·lules 116 proporcionen tots els gens adenovirals necessaris per a la replicació i l'empaquetament dels genomes lineals dels HdAd. Les partícules dels *helper* virus (HV) necessaris per a la producció dels HdAd són produïts per la transfecció de cèl·lules HEK-293 amb els genomes lineals dels virus, mentre que els HdAd són produïts per cotransfecció a les cèl·lules Cre 116 del genoma

of the...
 hedc e...
 ueó...
 terlc eó...
 α ed... 881... 88-... 88: S, ?



...
 A q edy...
 ql d róseq...
 uñc h zFe. c er...
 hFt...
 regeóydeóhed...
 α ed... 881S,

?

...
 fod qer...
 A...
 ...

?

?

?

?

?

4. MANIPULACIÓ DEL PÀNCREES PEL TRACTAMENT DE LA DIABETIS

Donada la complexitat estructural i la localització anatòmica del pàncrees, l'administració de gens al pàncrees és molt més complicada que en altres òrgans. S'ha intentat modificar genèticament el pàncrees mitjançant diferents tipus de vectors virals així com a través de diverses vies d'administració.

La injecció intraductal de liposomes catiónics de DNA va demostrar que es transduïen principalment cèl·lules ductals mentre que, quan s'injectaven per via intraarterial s'arribava a transduir les cèl·lules acinars (Schmid *et al.*, 1998). Una altra estratègia dissenyada va ser l'administració a les cèl·lules β de microbombolles de gas amb el DNA a l'interior per infusió sistèmica i la posterior destrucció de les microbombolles amb ultrasons (UTMD, *Ultrasound Targeted Microbubble Destruction*) al pàncrees. Tot i la utilització d'un promotor específic, la tècnica de UTMD no pot impedir que els òrgans que es troben a la mateixa trajectòria dels ultrasons també puguin ser transduïdes (Chen *et al.*, 2006). Aquests mètodes no virals van donar com a resultat l'expressió del transgèn a curt termini.

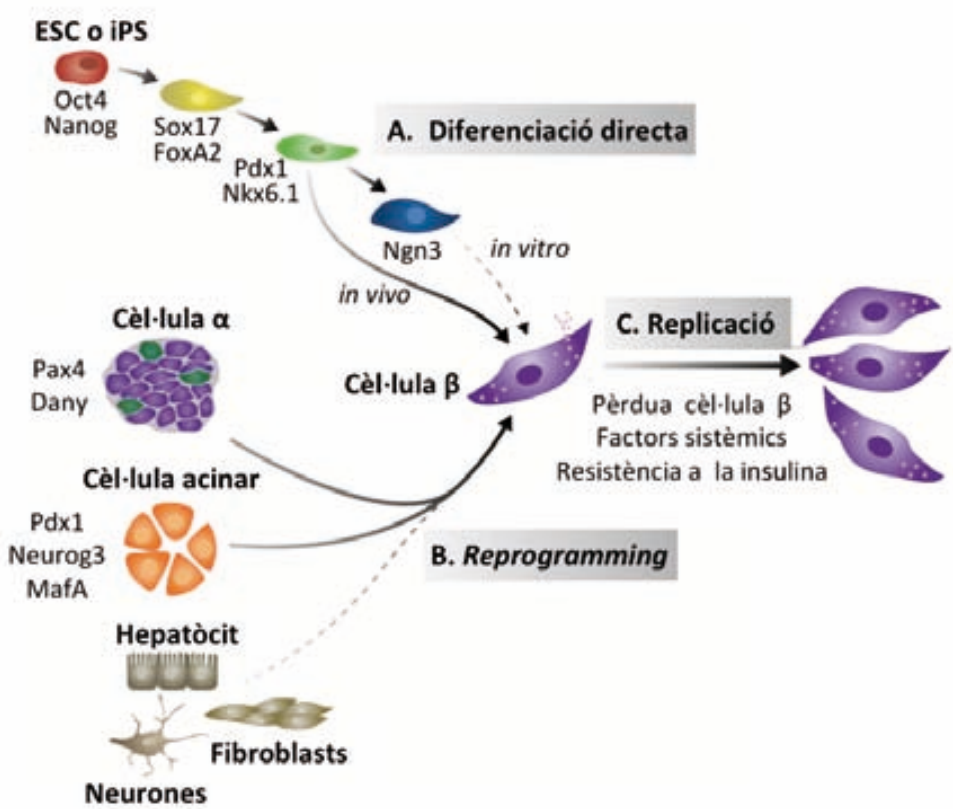
Els vectors virals, com s'ha descrit anteriorment, són eines molt eficaces per a la transferència de material genètic. L'administració d'Adenovirus al pàncrees per via intrapancreàtica (McClane *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004) i intraductal (Raper *et al.*, 1996; Taniguchi *et al.*, 2003) transduïa principalment cèl·lules exocrines, mentre que quan eren administrats per via sistèmica a ratolins tallant la circulació hepàtica es transduïa també preferentment les cèl·lules endocrines a ratolins (Ayuso *et al.*, 2004). La injecció dels Ad directament a la circulació pancreàtica en gossos també resulta en una transducció del pàncreas exocrí i endocrí (Ayuso *et al.*, 2006). No obstant, la immunogenicitat dels Adenovirus limitava l'expressió del transgèn, un problema que podria ser solucionat amb la utilització dels HdAd. Per altra banda, els vectors AAVs, a diferència dels vectors Ads i HdAds, presenten menor immunogenicitat i per tant expressió a llarg termini i la seva producció és molt més simple. Estudis amb els AAVs han demostrat la transducció al pàncrees tant a l'exocrí com en l'endocrí (Cheng *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, 2011).

4.1. Teràpia gènica per a la diabetis tipus 1.

Les estratègies actuals de teràpia gènica per a la diabetis tipus 1 poden ser *ex vivo* o *in vivo*. La manipulació genètica de les cèl·lules *ex vivo* permeten combinar una teràpia cel·lular (per exemple utilitzant cèl·lules β autologues) amb una modificació genètica

c euT u d e d e q l d o n e d r o s e d n r q T , d e d y h e o m m , e o q e r . d e r e r i e q . d e q l d o z f e d r o s e d e b e r e r o c A d e r o f . d e a d z f e i d e d e o h l o . e c f r t y d t o l e r . d l u f r d . l a e d y r q T ' . e d y h T h d e a e r . T a S e d e t e r e d d e o e c o o e u e q n o d f o e s e d e h y r q d e e o ' . e d y h T e q f d . T a S e r u f r d e d l u f q q i c u n f o f o r d e d e b t o e b . d h r q d e y . T q o . e d y h T d f a o . T f . T a S e o h d e a e r q i c d q c e r . d e e o q i c h o l q q T r o d e q f r u y d e o . e d y h T h o o l . T a S e b f o l e c d p 898 S,

d e o e r a l e h c e r . d e l a e o d . n t e o c A d e r o f . d e d e t e r e d d e o o e q n o d f a e o e s e a e o u e a t t f . e f r e q c h e c e d t e r . e o u d e d o r b o d e d e d q c e r . e u e o u t A e . T e h f o e , e b e . e b e r e d e o d . n t e o h d r q h a e r . e b e A T R G R U P D P d e A G R P V D e q n o d f a e o h d h l . e r . o s e d e d u f a T R G R U P D P d e G R C G I M D Q D P d e u f r e q n o d f o u b e d e r q T u u f o e h r q d e y . T q e b . d h r q d e y . T q S e r e f r e q n o d f o e s e d e h d l u f q l d u n f o f o r e s t a e r . e f r u f q q i c u e b G R C O P D P d e A R D F P Y Q A O R F e b e . e r . o e r e d e b t e h r q d e y . T q e f d e A S e t o f q e p 89/S,



MAGD. x e f v g d w m r f e c r g e d e d m r u r g d p d e a r u i e r f e p y q a o r f e b e d e r q T q i c u n f o f o r d e d e b t o e b . d h r q d e y . T q e c f r t y d t o l e r . d l u f r d . l a e d y r q T ' . e d y h T h d e a e r . T a S e d e t e r e d d e o e c o o e u e q n o d f o e s e d e h y r q d e e o ' . e d y h T e q f d . T a S e r u f r d e d l u f q q i c u n f o f o r d e d e b t o e b . d h r q d e y . T q o . e d y h T d f a o . T f . T a S e o h d e a e r q i c d q c e r . d e e o q i c h o l q q T r o d e q f r u y d e o . e d y h T h o o l . T a S e b f o l e c d p 89/S,

Durant molts anys una de les estratègies més estudiades per tractar la diabetis ha estat la generació de cèl·lules β *in vitro* a partir de cèl·lules progenitores de diferents tipus; per exemple ESC (*Embryonic Stem Cells*), iPS (*inducible Pluripotent Stem cells*) o cèl·lules progenitores adultes com les cèl·lules mesenquimals. L'objectiu final seria aconseguir una cèl·lula productora d'insulina i poder trasplantar-la en el pacient diabètic. Aquestes estratègies estarien englobades dins de la teràpia cel·lular, no obstant, cal destacar que en alguns casos la transferència de factors a aquestes cèl·lules es fa mitjançant tècniques de teràpia gènica amb vectors virals i no virals com és el cas de les iPS (Lee *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2013).

Una estratègia alternativa a la diferenciació de cèl·lules β a partir de cèl·lules mare pluripotents és la **reprogramació** de cèl·lules diferenciades adultes en cèl·lules β . En aquests casos es requereix la sobreexpressió de diversos gens. Els teixits amb més potencial per a ser utilitzats amb aquesta finalitat són el fetge i el pàncrees exocrí, ja que tots dos teixits provenen d'una cèl·lula progenitora comuna a la pròpia cèl·lula β . La transferència gènica a cèl·lules hepàtiques de factors de transcripció importants pel desenvolupament de les cèl·lules β (Pdx-1, Neurog-3 i NeuroD1 o MafA) mitjançant vectors adenovirals, pot induir la formació de cèl·lules productores d'insulina i reverteix la diabetis en ratolins (Kojima *et al.*, 2003; Yechool *et al.*, 2009). Per altra banda, s'ha demostrat que cèl·lules acinars pancreàtiques es poden reprogramar *in vivo* en cèl·lules productores d'insulina utilitzant adenovirus que expressen una combinació de 3 factors de transcripció (PDX1, Neurog3 i MafA), (Zhou *et al.*, 2008). En aquest cas es van administrar els Adenovirus de primera generació que expressaven els tres factors de transcripció sota el control d'un promotor ubic (CMV) directament al lòbul esplènic del pàncrees dorsal de ratolins NOD immunodeprimits. Un mes després del tractament més del 20% de les cèl·lules transduïdes eren positives per insulina, reduint així els nivells de la hiperglucèmia en animals diabètics (Zhou *et al.*, 2008). Per altra banda, el grup del Dr. Slack, ha publicat recentment estudis *in vitro* on mostren l'evidència d'un possible *reprogramming*, tot i no ser complet, de cèl·lules exocrines de rata (AR42j-B13) en cèl·lules productores d'insulina mitjançant un Ad-PNM (PDX1, Neurog3 i MafA) (Akinici *et al.*, 2012). A més a més, l'expressió ectòpica d'aquests tres factors al fetge mitjançant Adenovirus era capaç de revertir la hiperglucèmia en ratolins diabètics NOD-SCID (Banga *et al.*, 2012) i a ratolins immunocompetents CD1 (Banga *et al.*, 2013) quan era injectat per via intravenosa. En el cas dels animals CD1 era necessària una dosi viral superior a la que s'administrava als NOD-SCID per obtenir els mateixos resultats, tot i que l'efecte s'anava perdent gradualment augmentant de nou la glucèmia. En canvi, quan es tractaven ratolins

CD1 amb un agonista de PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), WY14643, que promou la divisió de les cèl·lules ductals, o amb un immunosupressor, els nivells de glucosa es normalitzaven durant més temps, degut a la presència de cèl·lules ductals productores d'insulina en el fetge (Banga *et al.*, 2013).

Aquests tres factors de transcripció Pdx1, Neurog3 i MafA estan implicats en la diferenciació de les cèl·lules β a partir de les cèl·lules progenitores (Mansouri *et al.*, 2012; Shih *et al.*, 2013; Ziv *et al.*, 2013) i a més regulen l'expressió de la insulina (excepte Neurog3) unint-se al seu promotor (Figura 5) (Ohneda *et al.*, 2000). **Pdx1** és un dels principals factors de transcripció, tant durant el desenvolupament embrionari del pàncrees, com per la diferenciació de les cèl·lules endocrines progenitores a cèl·lules β . Durant l'embriogènesi apareix per primer cop a dia e8.5 en el lòbul pancreàtic primigeni. En l'adult s'expressa en illots pancreàtics (cèl·lules β i δ), en ductes, al duodè i a l'estómac. En les cèl·lules β diferenciades, Pdx1 regula l'expressió d'insulina en resposta a glucosa, la qual ve regulada tant a nivell de fosforilació de la proteïna, com de la seva translocació al nucli (Al-Quobaili *et al.*, 2008; Andrali *et al.*, 2008; Habener *et al.*, 2005; Puri *et al.*, 2010). A més a més, Pdx1 actua com a factor de transcripció, que regula la transcripció dels gens de la insulina, del transportador de glucosa GLUT2 (Slc2a2), de l'IAPP (*islet amyloid polypeptide*), la glucoquinasa (Gck) i el factor de transcripció Nkx6.1. El factor de transcripció **Neurog3** és essencial en el desenvolupament del pàncrees marcant el llinatge de la cèl·lula progenitora cap a cèl·lules endocrines. S'expressa a partir del dia embrionari e8.5 i disminueix a partir del naixement, amb molt baixa o nul·la expressió en el pàncrees adult (Rukstalis *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2012). **MafA** juga un paper important en la regulació de l'expressió del gen de la insulina, a més a més d'altres gens com l'adiponectina, GLUT2, Nkx6.1, Pdx1, la Piruvat carboxilasa, Prohormona convertasa 1/3 i CHOP (*C/EBP homologous protein*). L'expressió s'inicia en els últims estadis del desenvolupament de les cèl·lules β al voltant del dia e13.5, suggerint un rol en el manteniment de la funcionalitat de la cèl·lula β (Andrali *et al.*, 2008; Hang *et al.*, 2011; Kaneto *et al.*, 2009).

Una altra via de transdiferenciació de cèl·lules acinars en cèl·lules productores d'insulina recentment publicada és a través del lligand unit al receptor de la hormona tiroide α (TR α). Mitjançant la injecció d'un adenovirus que expressa la TR α sota el control del promotor de l'amilasa2 i el tractament amb T3 (L-3,5,3-tri-iodotironina) d'animals immunodeficients hiperglucèmics s'aconsegueix reprogramar les cèl·lules acinars del pàncrees mitjançant l'activació de la via de senyalització de la PI3K, fosforilant i activant la Akt i conseqüentment l'expressió de Pdx1, Neurog3 i MafA (Furuya *et al.*, 2013).

Segons la metodologia utilitzada permet fer estudis d'expressió gènica, seguiment de creixement de tumors, la migració de cèl·lules al llarg del temps o la detecció de molècules o vies moleculars. Per la detecció d'una cèl·lula o teixit determinat es necessiten gens marcadors (*Reporter genes*). Els gens marcadors ideals han de complir les característiques següents :

1. La integració cromosòmica o l'expressió episomal del gen marcador no pot afectar negativament al metabolisme o a la fisiologia cel·lular.
2. El producte del gen no hauria de provocar una resposta immune a l'hoste.
3. La mida del promotor i el gen marcador ha de ser prou petit per cabre en un vector.
4. La transfecció o transducció amb el vector d'administració no han de ser citotòxic per a les cèl·lules.
5. La sonda indicadora ha de ser estable *in vivo* i arribar al lloc diana tot i les barreres biològiques naturals (paret del vas sanguini o barrera hematoencefàlica).
6. La sonda indicadora només s'ha d'acumular dins de les cèl·lules que expressen el gen reporter per augmentar el ratio de la senyal respecte el soroll de fons.
7. La sonda indicadora ha de ser eliminada ràpidament de la circulació per permetre la formació d'imatges repetitives dins del mateix individu.
8. La sonda indicadora o dels seus metabòlits no han de ser citotòxic per a les cèl·lules.
9. Les senyals d'imatges obtingudes s'han de correlacionar bé amb els veritables nivells de mRNA del gen reporter i les proteïnes *in vivo* .
10. El gen reporter i la sonda indicadora han de ser potencialment aplicables per a la formació d'imatges humanes en un futur.

Els gens reporters més utilitzats són la Luciferasa, la β -galactosidasa (β -Gal) i la proteïna GFP (*Green Fluorescent Protein*) ja que presenten una alta sensibilitat, i en menor freqüència la Fosfatasa Alcalina (seAP, *Secreted Alkaline Phosphatase*) (Figura 18) (Burdette *et al.*, 2008).

En l'estudi de la massa de cèl·lula β , aquests gens marcadors han de seguir unes premisses per tal que proporcionin la informació adequada tenint en compte que només representa entre el 1% i 2% del pàncrees (Brom *et al.*, 2010). Aquestes son les següents:

1. S'ha d'expressar a les cèl·lules endocrines del pàncrees específicament a les cèl·lules β i no a les cèl·lules α , δ i PP;
2. Alta absorció, transducció del gen reporter pel pàncrees endocrí i molt baixa per l'exocrí;
3. L'expressió del gen marcador s'ha de correlacionar amb la massa de cèl·lula β ;
4. Les diferències d'expressió del traçador, gen reporter entre un individu diabètic i sà ha de ser prou gran com per permetre detectar petites diferències de la massa de cèl·lula β ;
5. La relació entre l'expressió del gen reporter i el soroll de fons ha de ser alt; la fracció endocrina respecte la exocrina i també respecte la resta d'òrgans adjacents.

L'elecció del gen reporter, el substrat o l'agent específic i el procés biològic per activar l'expressió influirà en el sistema de visualització de les imatges. La majoria de les aplicacions es poden realitzar a tots els models animals i línies cel·lulars així com també tant a nivell cel·lular com amb tot l'individu sencer (Burdette *et al.*, 2008).

5.1.1. GFP (Green Fluorescent Protein)

La proteïna GFP (*Green Fluorescent Protein*) va ser descoberta a la medusa *Aequorea victoria* el 1962 (Shimomura *et al.*, 1962). Per a la visualització de la GFP no es necessita cap substrat per a poder detectar la fluorescència emesa per la proteïna, sinó que ha de ser excitada a una longitud d'ona determinada.

És àmpliament utilitzada com a gen reporter en estudis de biologia molecular, per a la visualització de diferents models cel·lulars o models animals *in vivo* (Crivat *et al.*, 2012). Hara i col·laboradors van generar un ratolí transgènic que expressa la proteïna GFP sota el control del promotor de la insulina del ratolí, MIP, de manera que obtenien una expressió estable i específica a les cèl·lules β del pàncrees (Hara *et al.*, 2003). Les dades preliminars indicaven la possibilitat de quantificar la massa de cèl·lula β *ex vivo* quan eren

analitzades per FACS (*cell sorter analysis*). A més a més, aquesta tècnica es va utilitzar per aïllar les cèl·lules β que expressaven el GFP per estudis *in vitro*. Aquests model de ratolí transgènic podia ser utilitzat per a l'estudi del desenvolupament de les cèl·lules β des de l'etapa embrionària fins a l'etapa adulta. A més, aquest model era adequat per estudiar la distribució tridimensional dels illots al pàncrees i quantificar la massa de cèl·lula β en les diferents etapes de la diabetis (Hara *et al.*, 2003).

5.1.2. β -Galactosidasa.

La β -Galactosidasa (β -Gal), derivada d'*E.coli*, és el producte gènic de l'operó bacterià LacZ. S'han modificat sintèticament diferents sucres cromogènics per tal de ser hidrolitzats per la β -Gal i així, generar un producte fàcilment detectable de manera similar a la luciferasa. Per exemple, la β -Gal hidrolitza el substrat X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosid) en 5-bromo-4-cloro-indigo de color blau. És un dels mètodes de visualització més comú amb elevada disponibilitat i amb molts substrats cromogènics i fluorogènics existents.

S'han obtingut resultats positius en ratolins transgènics en la detecció de la β -Gal en els pulmons, cervell, intestins, múscul, tim, testicles, ovaris, glàndules salivals, cor, fetge, ronyons, melsa i en estudis de tumors tant *in vivo* com *in toto* (Arlt *et al.*, 2012; Ishikawa *et al.*, 2011; Josserand *et al.*, 2007; Tung *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009b). Aquesta tècnica es pot adaptar per a la detecció *in vivo* de l'expressió de la β -Gal si s'utilitza un substrat que emet llum fluorescent al ser hidrolitzat, i aquesta fluorescència pot ser captada amb la càmera d'alta resolució CCD (*Charge Coupled Device*). Aquestes càmeres són altament sensibles donant nivells baixos de soroll de fons de llum visible emesos pels teixits. A més a més, la imatge es pot obtenir en uns minuts després de l'administració intravenosa o intraperitoneal del substrat cromogènic per la detecció de la β -Gal (Kang *et al.*, 2008).

5.1.3. Luciferasa

Una de les primeres aproximacions estudiades va ser la generació d'un constructe amb un promotor específic que regula l'expressió del gen reporter de la luciferasa a les cèl·lules diana. Per a la investigació de la diabetis, el gen reporter s'expressava sota el control d'un promotor específic de la cèl·lula β (promotor de la insulina de ratolí) (Park *et*

al., 2009). En aquest model, l'expressió del gen reporter s'indueïa només a les cèl·lules β pancreàtiques dels ratolins transgènics generats que produïen insulina i contenien el constructe. La reacció enzimàtica a les cèl·lules que expressaven l'enzim reporter (luciferasa) i amb el substrat (luciferina) generaven fotons que podien ser capturats per una càmera d'alta resolució CCD (Park *et al.*, 2005).

5.1.4. seAP (Secreted Alkaline Phosphatase).

Per altra banda, el disseny de tècniques amb proteïnes secretables a la sang que actuïn com a gens reporters són eines molt valuoses per a la detecció ràpida i sensible que permeten la quantificació, la monitorització no invasiva de processos biològics en experiments preclínic d'animals. Els nivells de les proteïnes secretables poden ser avaluats diverses vegades al llarg del temps i amb el mateix animal (o també cultiu cel·lular) a través de petites quantitats de sang, sèrum, orina i sense haver de sacrificar l'animal. Gràcies a aquestes propietats, aquesta tècnica ha estat utilitzada per l'estudi al llarg del temps del desenvolupament embrionari, la difusió viral, la transferència de gens, el creixement de tumors o la resposta a un tractament (Tannous *et al.*, 2011).

La Fosfatasa Alcalina (seAP) és un enzim que es secreta amb facilitat per la cèl·lula, i això fa que sigui fàcilment detectable al medi de cultiu de les cèl·lules o a la sang. Les característiques principals de la SeAP com a gen marcador són: alta sensibilitat, no immunogènica, permet el seguiment de l'animal sense haver de sacrificar-lo i per tant, pot ajudar a definir dosis mínimes del gen terapèutic. En resum, la SeAP reflecteix la supervivència de les cèl·lules. S'ha utilitzat en estudis per monitoritzar l'expressió de gens després de la transferència gènica (Cutrera *et al.*, 2011; Hughes *et al.*, 2009), monitoritzar el creixement de tumors i resposta a tractaments (Chaudhuri *et al.*, 2003; Shimajiri *et al.*, 2011), monitoritzar factors de transcripció, vies de senyalització i estrès de reticle (Hiramatsu *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2005; Shiraiwa *et al.*, 2007) i l'avaluar l'expressió de la seAP a llarg termini en models animals (Gerard *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2001). Un exemple són els animals transgènics que expressen la seAP sota el control del promotor Pdx. Aquests animals poden ser una eina molt útil per a avaluar l'expressió del promotor *in vivo* i per la detecció de noves molècules que regulen l'expressió del gen en qüestió (Shiraiwa *et al.*, 2007)

III. OBJECTIUS

Una reducció de la massa de cèl·lula β funcional comporta el desenvolupament de la diabetis mellitus. Alguns tractaments experimentals per contrarestar els efectes de la malaltia es centren en regenerar la massa de cèl·lula β . Per poder avaluar l'eficàcia d'aquestes teràpies seria de gran interès disposar de sistemes d'anàlisi de la massa de cèl·lula β en els animals d'experimentació a llarg termini.

Per tant, l'**objectiu general** d'aquest estudi va ser **desenvolupar noves aproximacions de manipulació genètica del pàncrees per a l'estudi *in vivo* de possibles teràpies per a la diabetis mellitus**. Aquest objectiu general es subdivideix en els següents objectius específics:

1. *Obtenir i analitzar els animals transgènics RIP-I/ β -Gal.*

1.1. Generar i caracteritzar el ratolí transgènic RIP-I/ β -Gal que expressa la β -Gal específicament a les cèl·lules β del pàncrees.

2. *Manipular el pàncrees *in vivo* mitjançant vectors adenovirals helper dependents (HdAd).*

2.1. Generar els vectors virals HdAd que permetin expressar gens marcadors a les cèl·lules β i acinars del pàncrees.

2.2. Avaluar la transducció del pàncrees mitjançant els vectors HdAd per diferents vies d'administració i a diferents soques de ratolí.

3. *Desenvolupar una estratègia de teràpia gènica per a la diabetis basada en la regeneració de la massa de cèl·lula β a partir de la transdiferenciació de cèl·lules acinars del pàncrees.*

3.1. Generar un vector viral AAV que expressi el gen marcador seAP específicament a les cèl·lules exocrines del pàncrees.

3.2. Regenerar la massa de cèl·lula β a partir de la transdiferenciació de cèl·lules acinars del pàncrees mitjançant els vectors AAV que expressin Pdx1, Neurog3 i MafA.

IV. RESULTATS

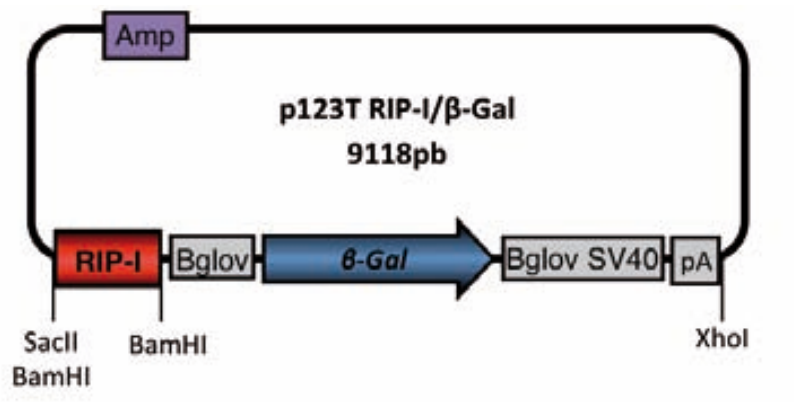
***Part I: Obtenció i anàlisi dels animals
transgènics RIP-1/ β -Gal***

bxzÍ UFVGAPP dZAROVRU LÀ Q YG P 2021-2022 cw+2 DO

2c A2N Aieq. F2uN A. er T2Fr 2d .l g2d r ót nr T2z Fe2e Bhdeó2T2b 2áx2 o q.l óT2i ó 2'βx
2 2S 2eó2nó'f 2eó2á 2ueó2h r q2e2eó2 222x20βx2 2S 2T2e2d2y2q2T2c er. 2ue. eq. A2e2eó2á 2er ed d2 2
h d 2T2ue2ho óc 2T2T2F. edc euT 2d2B2h2deó2er. ó2 2d2b Al d .l d2T2e2c2h2l r ó. d2F2q. e2h296/22222x20áx2 2
"2T2F2d 2S2.

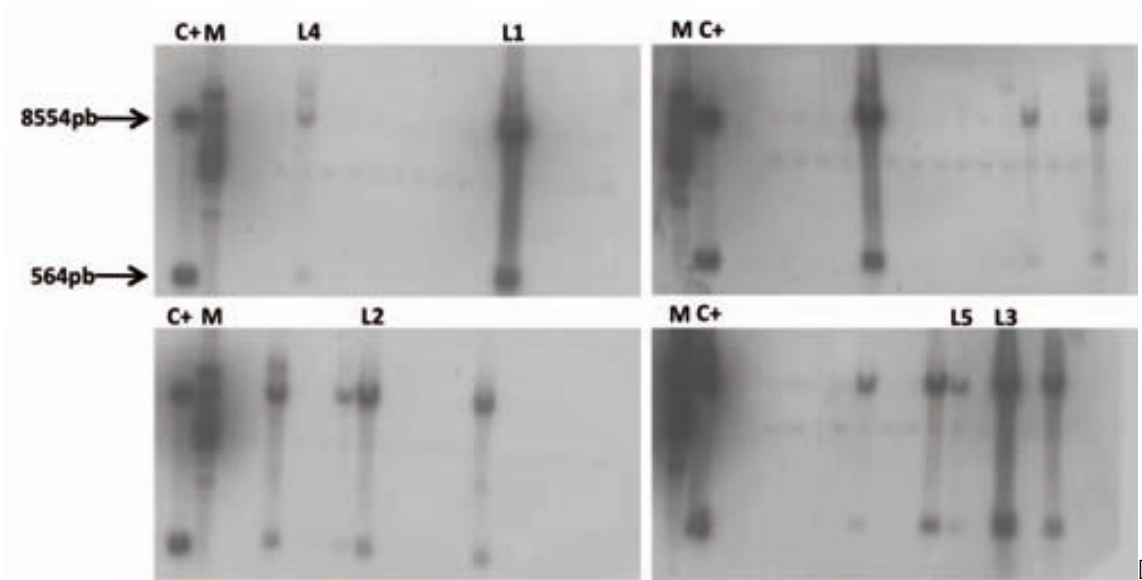
2ed2 2áN2q2l r óet F2T2e2B2h2deó2T2G2ue2áx2 2eó2heq2s2T2c er. 2 2eó2nó'f 2eó2á 2ueó2T2d .ó2
ue22 r2teda r ó2eó2á 2F. T2E d2e2h2d c l.l d2ue2á er 2ue2b 2T2ó2F2T2 2ue2á . 2222x2S, 22z2Feó. 2
h2d c l.l d2h2edc e. 2e2B2h2deó2T2G2u2N2F2r2er 2E2B2l2ter 2 2eó2nó'f 2eó2á 2ueó2h r q2e2eó2 r. 2E2r2r2T2 2ó2
. d r ót nr T2q2h2l c 2E2r2g2T2eó2nó'f 2o d2á2ue2á ueó2ue2nó'f 2eó2á 2E2r2h2F2o2T2 2D2ed2. 2 2o29K- / 2
2 r a r 2o2K-1 2e2uer 2. 2 2o29K-À 2e2F2q2a2T2T2. 2 2o29K-À 2e2d c l.r. x2 q2F2e2. 2 2o29KK8S,2

2 2d2ho óc 2T2T2A. T2t2F. 2h296/22222x20áx2 2h2deó2er. à 2e2d2i 2óe. 2e2B2h2deó2T2G2e2o2r2z2Fei .2
c A2u2Feó2u2T2reó2ue2e2eó. d2h2q2G2E2r2Z2Feó2 2q222al 2S2h2ed2h2l ó. edT2dc er. 2e2d2T2 T2d2T2ieq. .2
óer 2e2ez (nr q2eó2h2l 2ueó2Ti ueó2ue2ho óc 2T2T2



2 M2G2D2x22 EVRUP d2AROV2DUF2MU2222+2β+2DO22ó2á 2bFAq2d r 2d2b 2βx2 2ó2l. 2e2d2h2r. d2 2ue2h2d c l.l d2222x2222
so r2z2Fei . 2E2r. d2e2eó2e2c er. ó2T2et Fo ul d2ó2T2d à 2222: 8, 22ó2E2r2E2T2 2ó2ue2e2eó. d2h2q2G2E2r2Z2Feó222
hedc e. er 2e2h d 2e2c2h2l r ó. d2F2q. e2h2N2F. ednó2c A2e2d2i 2óe. 2e2B2h2deó2T2G2ue2e2h2o óc 2g2T2.

2
2 2r 2q2l h2T2 A. T2t2F. 2e22q2l r ó. d2F2q. e2h296/22222x20áx2 2e2eó2á 2h2d2l2q2u2T2 2q2l c h2d2 à d2
2e2B2h2deó2T2G2ue2á 22222m2ni, qnó'f 2eó2á 2E2r2h2F2o2T2, 22c A z2Feó. 2T2 2T2 2e2ó2á r 2d2r 2óseq. d2
qnó'f 2eó2á 2x29 2eó2nó'f 2eó2á 2ue2á ueó2ue2N2F2r2T2ó2F2T2l c 2ue2á . 2E2a2T2D22, 2, 22229K77S2 2c A2
e2h2o óc 2T2T2h296/22222x20áx2 2h2T2h2F2o2d2 2c A2e2d2 r ót nr 22222x20áx2 2ó2F2e 2u2T2ed2T2 2c A2
2al 22222 q2222 Z2Fe2í 22e2e2sd t2c er. 2Z2Fe2h2l 2ó. edT2dc er. 2ó2N2F. T2E dy2eó2heq2s2T2c er. 2h2ed2
2tered d2e2ó2 r2T2 2ó2 d r ót nr T2q2222x20áx2 2d 2c A2F2r2T2h2l 2h2l 2T2F2222 22Oáx2 2d 2c A2
e2B2h2deó2T2G2FA2Z2F, 22e2eó2 - 2al d2eó2ue2h2d2i 2ó2ue2b 2d2 r 2óseq2G2e2e2á r 2S2B d2eó2nó'f 2eó2c A2
h2d2s2l2dc 2uea2T225 2T2e2á 2e2d2b 22T2F2q2G2E2r2Z2Feó222 q2222h2h2N2F2r 2al d2 2 2N2A2e2d2à àer 2 2t2F2reó2
qnó'f 2eó2á 2o àeó, 2222o 22T2F2d 2622ó2N2A2e2d2à 2e2B2h2deó2T2G2ue2e2o 2áx2 2d. r. 2 2eó22qnó'f 2eó2



Az ábrán azonosított géntípusok: C+M (Control + M), L4, L1, M C+ (M + Control), C+ M, L2, M C+, L5, L3. A képen látható sávok a 8554bp és 564bp méretűek.

2

Az eredmények alapján a vizsgált minták közül a C+M és M C+ minták pozitívan reagáltak a vizsgált géntípusokra. A L4, L1, L2, L5 és L3 minták nem reagáltak a vizsgált géntípusokra. Az eredmények alapján a vizsgált minták közül a C+M és M C+ minták pozitívan reagáltak a vizsgált géntípusokra.

2

Az eredmények alapján a vizsgált minták közül a C+M és M C+ minták pozitívan reagáltak a vizsgált géntípusokra. A L4, L1, L2, L5 és L3 minták nem reagáltak a vizsgált géntípusokra. Az eredmények alapján a vizsgált minták közül a C+M és M C+ minták pozitívan reagáltak a vizsgált géntípusokra.

2

Az eredmények alapján a vizsgált minták közül a C+M és M C+ minták pozitívan reagáltak a vizsgált géntípusokra. A L4, L1, L2, L5 és L3 minták nem reagáltak a vizsgált géntípusokra. Az eredmények alapján a vizsgált minták közül a C+M és M C+ minták pozitívan reagáltak a vizsgált géntípusokra.

2

2

2

Així doncs, la L3 que presentava un major nombre de còpies del transgèn observàvem menor expressió de la β -Gal. En canvi, la L5 la qual presentava menys nombre de còpies, presentava un 90% d'expressió de cèl·lules doble positives β -Gal/Insulina. Aquests resultats suggerien un fenomen de silenciament del transgèn per mecanismes epigenètics, o un efecte degut al lloc d'integració del transgèn.

1.5. Anàlisi de l'absència d'expressió del transgèn en algunes cèl·lules β .

Per tal d'estudiar si hi havia mecanismes epigenètics implicats en l'absència d'expressió del transgèn en algunes cèl·lules β es va avaluar l'expressió de la β -Gal dels animals transgènics de les línies L3 (elevat nombre de còpies) i la L4 i L5, amb un nombre de còpies semblants, a diferents edats: a les 3, a les 12 i a les 40 setmanes d'edat.

S'ha descrit que l'edat i el nombre de còpies integrades al transgèn poden tenir un efecte important en l'expressió.

Així, es va analitzar l'expressió de la β -Gal als illots pancreàtics a les 3 i 40 setmanes d'edat de les tres línies estudiades. A la figura 8 tant a les 3 com a les 40 setmanes d'edat s'observava expressió de la β -Gal a les cèl·lules productores d'insulina a les línies analitzades (Figura 8). Tot i així, tant a la L3 com a la L4 l'expressió continuava sent molt baixa on no totes les cèl·lules β del pàncrees productores d'insulina també eren positives per la β -Gal en comparació amb la L5.

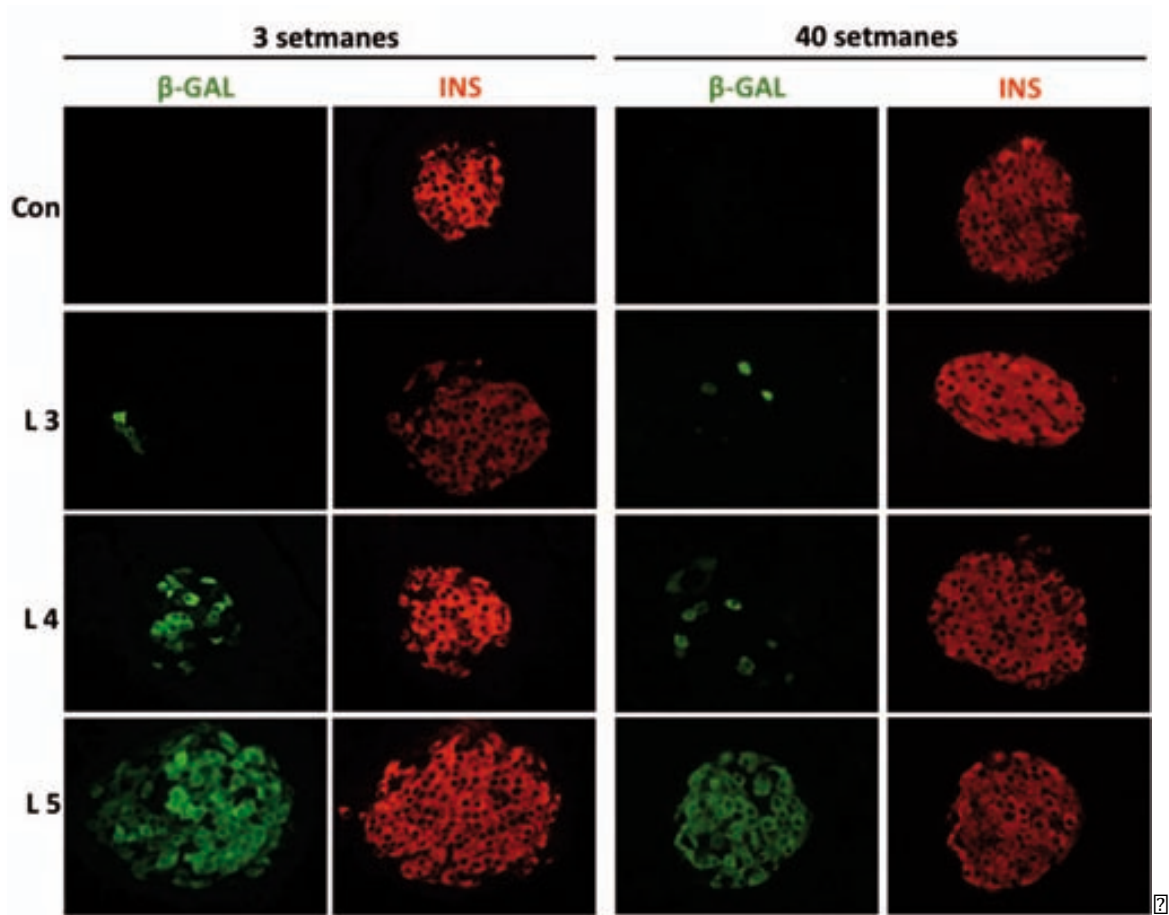
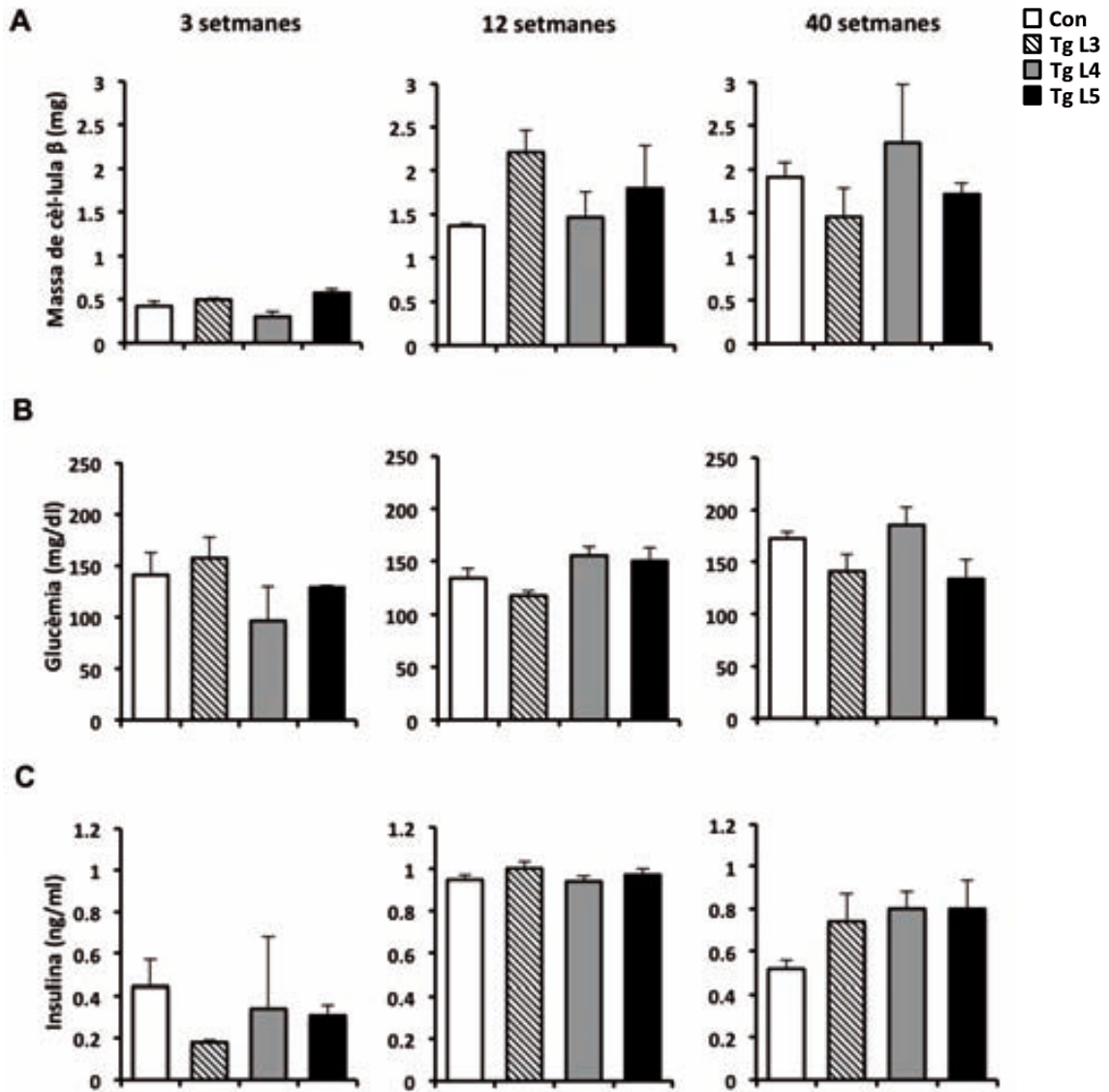


Figure 1. Expression of beta-galactosidase and insulin in the pancreas of transgenic mice. The images show the expression of beta-galactosidase (green) and insulin (red) in the pancreas of transgenic mice at 3 and 40 weeks of age. The rows represent different groups: Con (control), L3, L4, and L5. The columns represent the time points: 3 weeks and 40 weeks. The images show that beta-galactosidase expression increases over time, while insulin expression remains high.

2

The results show that the expression of beta-galactosidase increases over time in the pancreas of transgenic mice. This is evident from the increasing number of green cells in the beta-GAL column from the L3 group to the L5 group. Insulin expression, shown in the red column, remains strong and consistent across all groups and time points. The control group (Con) shows minimal beta-galactosidase expression and strong insulin expression. The L3, L4, and L5 groups show a progressive increase in beta-galactosidase expression, indicating that the transgene is being expressed and that the beta-galactosidase enzyme is being produced and localized in the pancreas. The insulin expression is also strong in all groups, suggesting that the transgene is also being expressed and that insulin is being produced and localized in the pancreas.



MAGb6x22DGPVRG WDP d2AR2D2PYG0A0E22D2ORF25 mb3 2f 62FRQ DURF2ARADV22à d f qIGueó2r 2heó2ue2 t2Fqc T 2er 2ó2c er. qIG22S2c ó2 2ue22n2ó2fo 2222S22E 2heó22n2r 2ó2f2 22S22ue22r 2E 2ó2d 2r2t 2nr 2q2ó2r 2l 2r. 2d 2 ue22 u 2q 2T 2ó2FuTu 2r 2de2ó2u . 2ó2Beder. 2ó2 22622 282e.c 2re2ó2Nu . 22ó2de2ó2fo . 22Gr 2b 2Ti r 2222 2ue2 /2r 2E 2ó2ue22 u 2dFh, 22t-2d 2r2t 2nr 2q.

22 2í2 2 2í2222 2r 2E 2er 2zFe2. 2ó2r 2E 2ó2 2l 2d 2l 2d 2t 2222. 22AFq 2Gue22e22 qn2ó2f 2e22er 2ul 2q 2F 2e22ue22 2hyr 2q 2de22c 2Ti 2r 2p 2r. 2E 2c 2Frl 2a 2. 2l 2zFg 2q , 22222 2 2A2ed2 22zFe2 er. 2de22e22d . 2l 2F 22q 2l 2r. 2d 2222 2d 2r2t 2nr 2q2ó2r 2l 2a 22a 2à 2Tu 2Bedr 2q 2e22er 222B 2de22ó2G 2r 22er 2b 2 u 2. 22AFq 2Gue22e22 qn2ó2f 2e22e22. 22nd 2u 2q. 2l 2de22ue22 2f 2q 2t 2G2r 22er 22e22 qn2ó2f 2e2222 22nd 2u 2q. 2l 2de22 u 2F 2ó2f 2 22e22Beder. 2ó2u . 2222 2F 2d 29S, 22

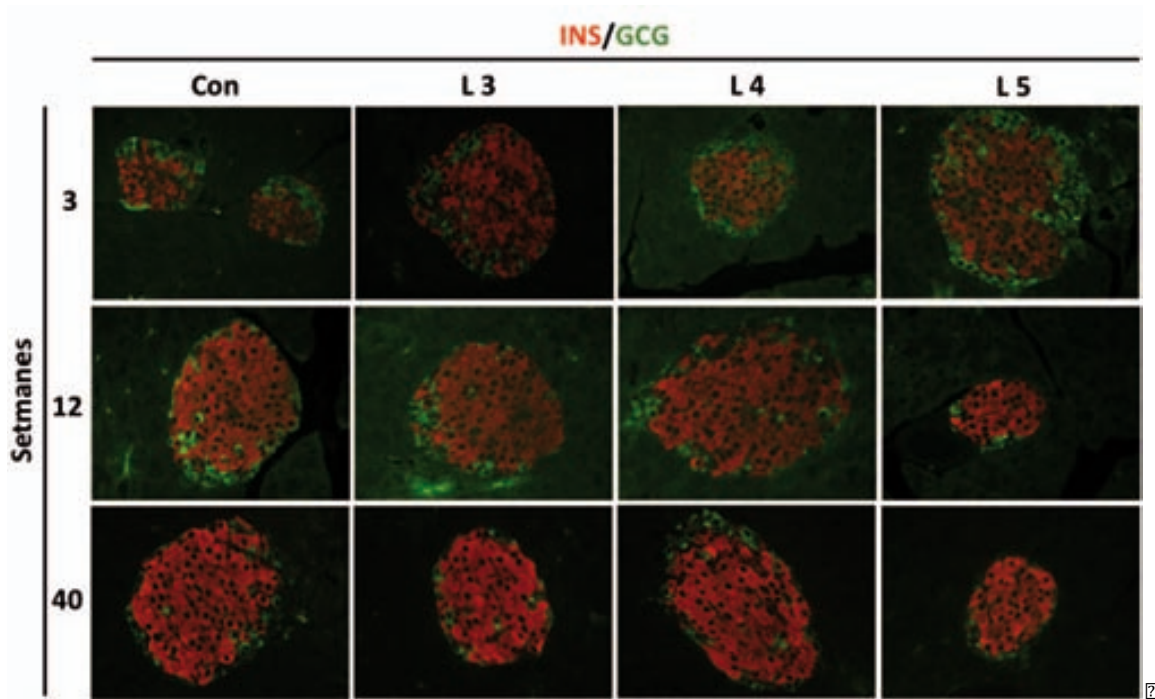


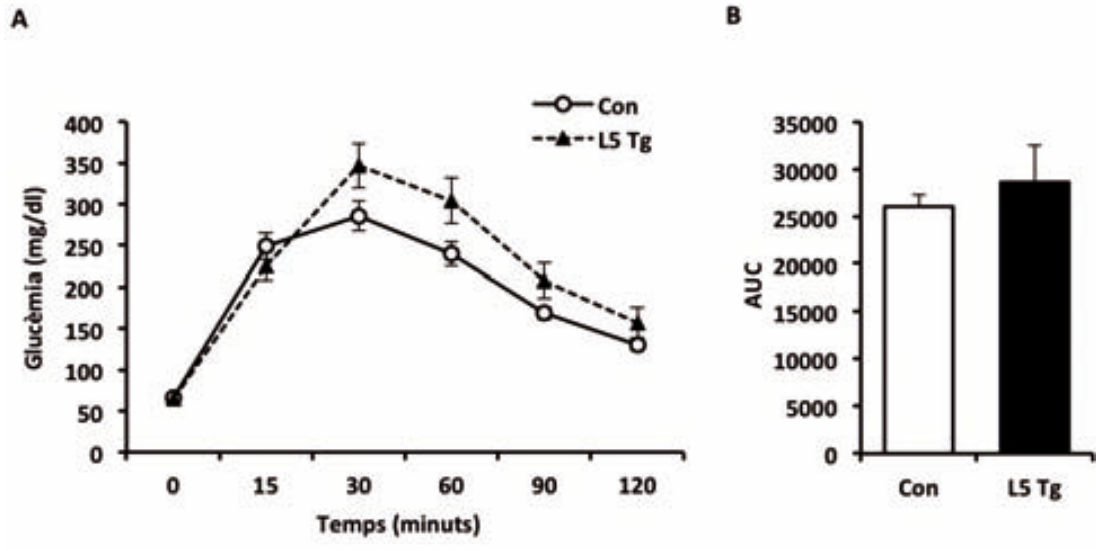
Figura 1. Expresión de β -cas en células de la glándula mamaria de ratas en las semanas 3, 12 y 40 de vida en los grupos Con, L3, L4 y L5. Las imágenes muestran la expresión de β -cas (rojo) y GCG (verde) en las células de la glándula mamaria. El eje vertical indica el tiempo en semanas (3, 12 y 40) y el eje horizontal indica los grupos experimentales (Con, L3, L4 y L5).

2

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la restricción proteica en la expresión de β -cas en las células de la glándula mamaria de ratas en las semanas 3, 12 y 40 de vida en los grupos Con, L3, L4 y L5. Los resultados muestran que la restricción proteica afecta la expresión de β -cas en las células de la glándula mamaria de ratas en las semanas 3, 12 y 40 de vida en los grupos Con, L3, L4 y L5. La restricción proteica afecta la expresión de β -cas en las células de la glándula mamaria de ratas en las semanas 3, 12 y 40 de vida en los grupos Con, L3, L4 y L5.

Los resultados muestran que la restricción proteica afecta la expresión de β -cas en las células de la glándula mamaria de ratas en las semanas 3, 12 y 40 de vida en los grupos Con, L3, L4 y L5. La restricción proteica afecta la expresión de β -cas en las células de la glándula mamaria de ratas en las semanas 3, 12 y 40 de vida en los grupos Con, L3, L4 y L5. La restricción proteica afecta la expresión de β -cas en las células de la glándula mamaria de ratas en las semanas 3, 12 y 40 de vida en los grupos Con, L3, L4 y L5.

2



El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón. El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón. El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón.

2

El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón. El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón. El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón.

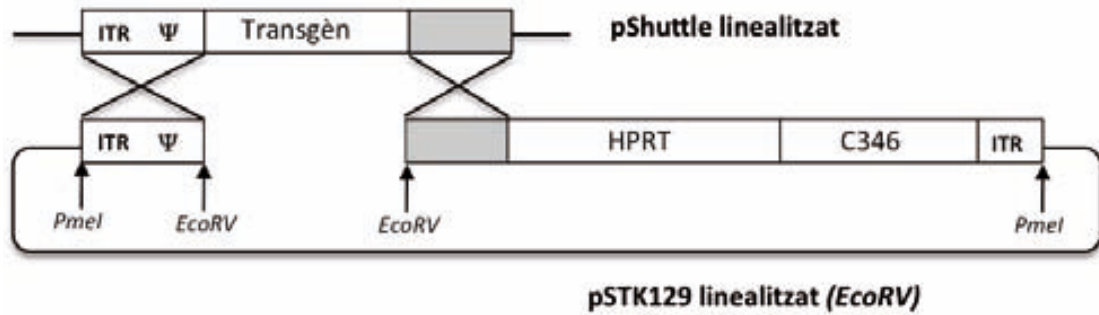
2

El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón. El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón. El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón.

El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón. El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón. El efecto de la insulina en la liberación de glucosa por el hígado en el ratón.

***Part II: Transducció al pàncrees mitjançant
vectors virals HdAd***

El vector de clonatge ATC-GalC-Dt per a qPCR de l'òc *T. dscp* zFeql r. í ed d rónr UNF.ednóà ede de e dE . d Ti rp r. Fr Er Et he deó. d hqGz Fe ω à edeq. l d A qedy, 202h2222à eded uT edT c A2ql 222"zFe2eó. dl A 2erc T 2ue2o 2óerb d unch zFe. cer. 2222222. Fssedne2l. ó2óho óc Tu2h2222Shed2ed de e dE . d c Aí, 2 2l. ó2ul ó2ho óc Tu22 de e dE . ó2à r 2ed2ql xd r ósl dc . ó2er 2qnd'f 2eó2222 p22NHKM2hed2 s q2 d d2 deql c ATC-GalC-Dt 2 2ql c 2ó2 l ó. d 2 2 22 Fd 21, 2



El vector de clonatge ATC-GalC-Dt zFe2eóhd uFe22 2eó2qnd'f 2eó2A qedyT reó2222 p22NHKM2ueóhd ó2ue2o 2 d r ósl dc qGz c A2eó2ho óc Tu22 de e dE . ó2h2aF.. 2222, 2

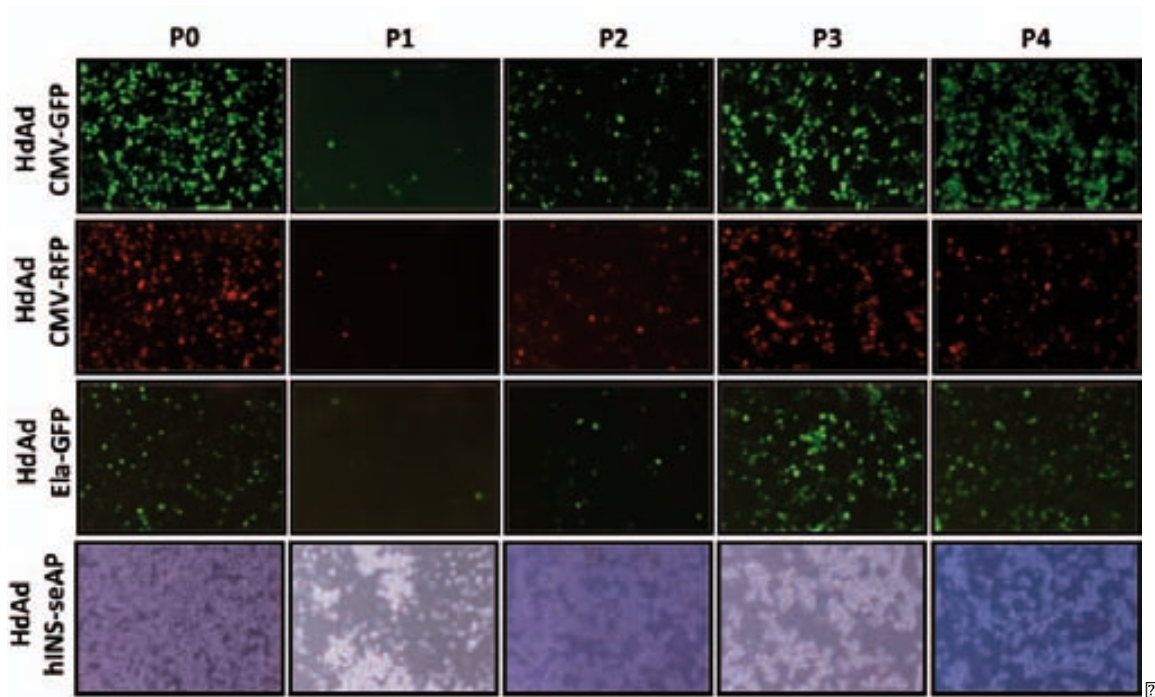
2

3x27 Q COTPD d 2ARCF 2ERPÍ GF 22 A2A2RURGDF 2

El vector de clonatge ATC-GalC-Dt 2ó2à r 2ered d22edó ó2u2u2h22: 2 h22K22h2299S22à r 2ed2ql ch d. ó2c A2r 2ho óc Tu22u2u2ered. 2hed2of q2eó. yru du2 "h227S, 22

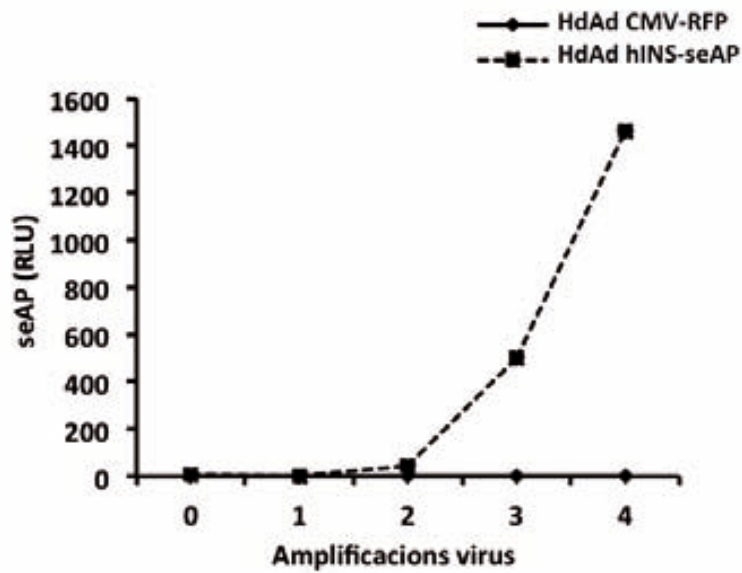
El 2èql d2 à 2 d 2u2ux22 2x2222" rlc er . 2 h22: S2 eB2deóó à 2 o 2hdl. eM 2 sFl deóqer. 2edc eo 2222222. 2ed2ql r. dl 2ueóhd c l. l d2FAT2l qTlc et d à 2Fó222 2S2ed 2u2uxeó. ó 22222h22K22eB2deóó à 2 2hdl. eM 2sFl deóqer. 2ed2ql d d2edu2222222. 2ed2ql r. dl 2ueóhd c l. l d2eóh2s2222h22y2deé2o. ó 22dFó2 c22222KK/ 22 c22222KK1S2222 2u2uxa2r óxó2222" h2299S22eB2deóó à 2o 2sl ós. ó 2 2q of 2óeqde. A22ued2à u 2ue2o 2 ho qer. 2aFc r 2ól. 2ed2ql r. dl 2ueóhd c l. l d2ue2o 22r óF of 2aFc r 2'22 Fd 22ÀS, 22ed2 tered d2ed2h22: 2ed2ql óe. 2u2B2deóó2G2'22 2x222222à 2ed2qd r . 2er 2ed2h2aF.. 22229222 T2ed . 2r 2ed2h2296K22ed2ql c ATC-GalC-Dt 2ql c 2ó2 l ó. d 2 2 22 Fd 21, 222à 2ed2 ed2 . e2B2hd qeu2c er. 2F r 2ó2à 2ered d2ed2h22K, 222h2299222à 2 A. er 222h d 22ue2o 2 qd r q2G2ed2l óe. 2u2B2deóó2G22a 22xó222222er 2ed2h2aF.. 22226222 deql c ATC-GalC-Dt 2 eó2à 2ed2c A2ed2h222299K,

2



2021-2022 | 2021-2022 | 2021-2022 | 2021-2022 | 2021-2022

2021-2022



2021-2022

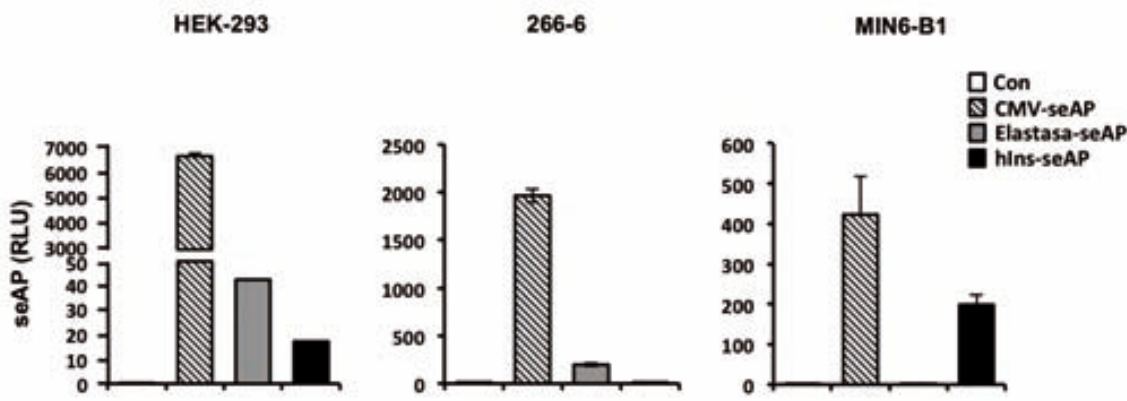
2021-2022 | 2021-2022 | 2021-2022 | 2021-2022 | 2021-2022

2021-2022

2021-2022 | 2021-2022 | 2021-2022 | 2021-2022 | 2021-2022

2021-2022

The results of the study show that the expression of the reporter gene (GFP) is significantly higher in cells transfected with the CMV-seAP construct compared to the control (Con) and the other two constructs (Elastase-seAP and hns-seAP). This indicates that the CMV promoter is more active in these cells. The results are summarized in the following table:



The results of the study show that the expression of the reporter gene (GFP) is significantly higher in cells transfected with the CMV-seAP construct compared to the control (Con) and the other two constructs (Elastase-seAP and hns-seAP). This indicates that the CMV promoter is more active in these cells. The results are summarized in the following table:

2

3.5. The effect of the promoter on the expression of the reporter gene in different cell lines

The results of the study show that the expression of the reporter gene (GFP) is significantly higher in cells transfected with the CMV-seAP construct compared to the control (Con) and the other two constructs (Elastase-seAP and hns-seAP). This indicates that the CMV promoter is more active in these cells. The results are summarized in the following table:

The results of the study show that the expression of the reporter gene (GFP) is significantly higher in cells transfected with the CMV-seAP construct compared to the control (Con) and the other two constructs (Elastase-seAP and hns-seAP). This indicates that the CMV promoter is more active in these cells. The results are summarized in the following table:

2

Fig. 1. *In vivo* GFP expression in the pancreas of *Drosophila melanogaster* after injection of GFP-expressing plasmids. The figure shows GFP expression (top row) and H&E staining (bottom row) in the pancreas at 5, 15, and 30 days post-injection. At 5 days, high GFP expression is observed. At 15 days, GFP expression is significantly reduced. At 30 days, GFP expression is nearly absent. H&E staining shows the morphology of the pancreas at each time point.

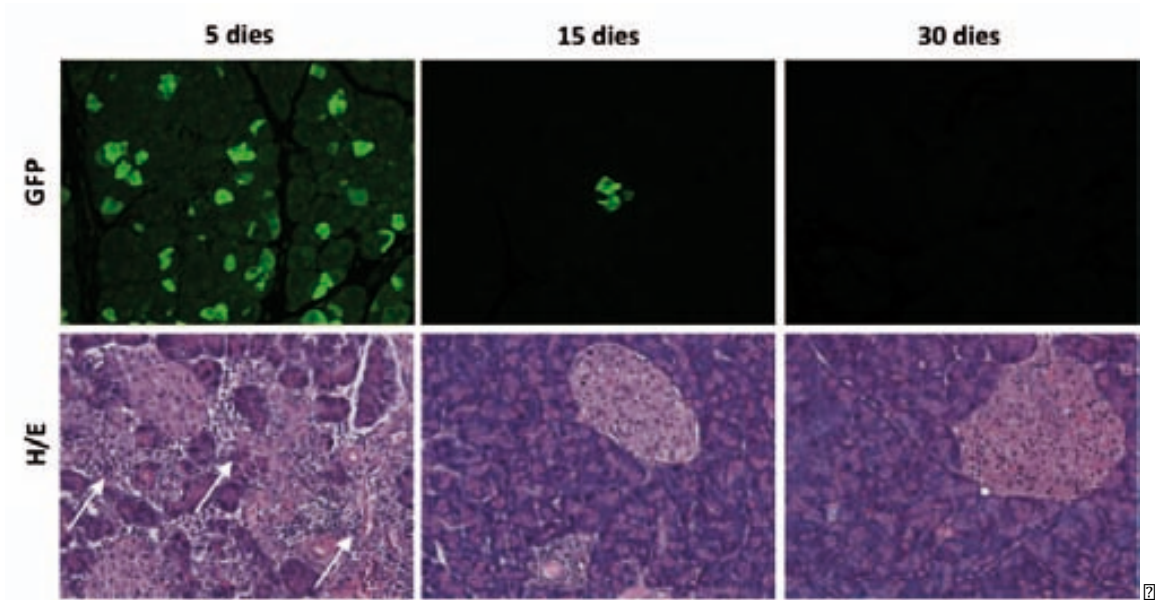
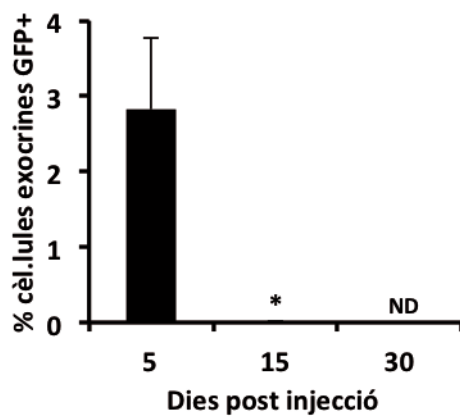


Fig. 1. *In vivo* GFP expression in the pancreas of *Drosophila melanogaster* after injection of GFP-expressing plasmids. The figure shows GFP expression (top row) and H&E staining (bottom row) in the pancreas at 5, 15, and 30 days post-injection. At 5 days, high GFP expression is observed. At 15 days, GFP expression is significantly reduced. At 30 days, GFP expression is nearly absent. H&E staining shows the morphology of the pancreas at each time point.

□



□

Fig. 2. Bar graph showing the percentage of GFP-expressing exocrine cells in the pancreas of *Drosophila melanogaster* at 5, 15, and 30 days post-injection. The y-axis is labeled '% cèl. lules exocrines GFP+' and the x-axis is labeled 'Dies post injecció'. The percentage of GFP-expressing cells is significantly reduced at 15 days and is nearly absent at 30 days.

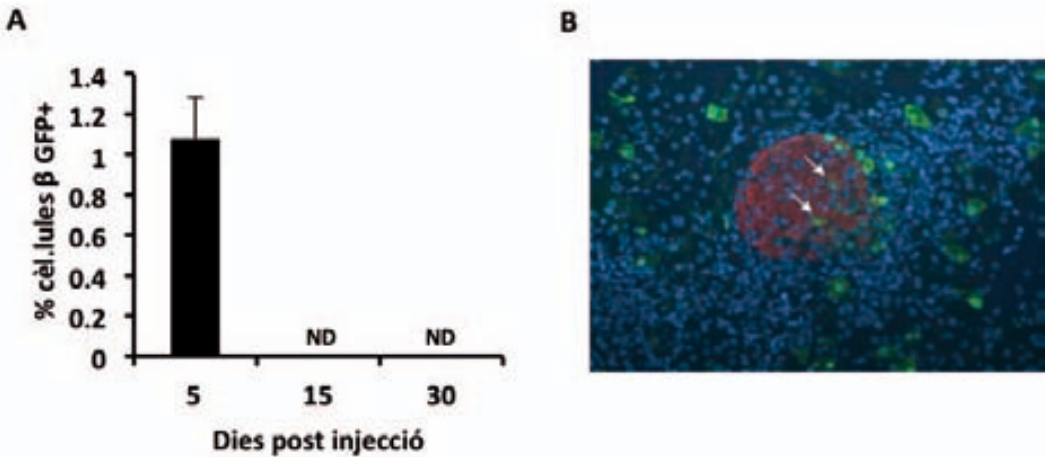
□

Fig. 3. *In vivo* GFP expression in the pancreas of *Drosophila melanogaster* after injection of GFP-expressing plasmids. The figure shows GFP expression (top row) and H&E staining (bottom row) in the pancreas at 5, 15, and 30 days post-injection. At 5 days, high GFP expression is observed. At 15 days, GFP expression is significantly reduced. At 30 days, GFP expression is nearly absent. H&E staining shows the morphology of the pancreas at each time point.

□

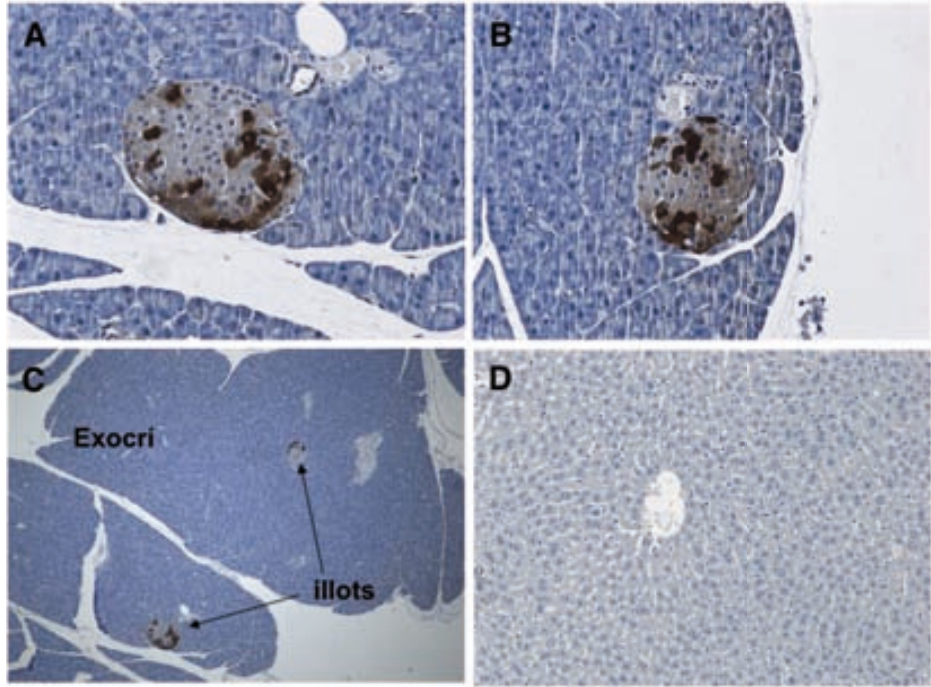
91/81 Teóhí ó.edí d6277Fd 6802S, 2006c sCqT62 c Aí 66hdeóer. àer 22al o r. 2ueó2 Td .óh r qdey. T62 Fe6Bhdeóó àer 6 hnd .eM 22277Fd 662S,2

2 dyq'662 2aéó2uFr 2ul Aæ27E c Frl aT.l zFg: Tq 2ql r.d 2227777FóFóF 2eó2à 2 zF r. 2Tq d2e2hedqer. .te2ue2qno'fæó22d r6uFMeó2 ó2 r'E ó27Fieq. .62 c A2e2æq.l d2 2u2ux22 2x222,22hd BTc u c er. 2095 2ue2aé2qno'fæó2hl óT'æó2hed27FóFóF 2à r 26ed2 .d r6uFMeó2 ó2 2Teóhí ó.edí d62 2 27Fieqq'G2 c A2e29/0A5 2ueó2Td .62 Fe2er er 2æ er b62 Fr 2qno'fo 2222xhl óT'æ S,22edC2 zFeó.eó2qno'fæó222202eó2à r 2deuF'22uFr 2c red 2 óec Ao r. 2 2eó2qno'fæó2 qF d6277Fd 662S2er óe2ue.eq. dxr e2eBhdeó62G2 ó29127/81 Teó2 hl ó. 27Fieqq'G,2



2 MÀG23:22 ÀDUVTPDP d2AROCRCPRUVDWR2ARAGDUFAAPP d2DOCHUPGRRFRUAÍ PGæ2hedqer. .te2ue2eó2qno'fæó2 ul Aæ2hl óT'æó2hed27FóFóF 2222222 d2h2r qdeé2ueó2 r'E ó27Fieq. .62 c A22u2ux22 2x222,22n2-22ryó62 2E c Frl aT.l zFg: T2ue22222æduS27FóFóF 2ædc eó222222Ao FS,227-22eó2æ. Beó27 u'2 Fer 2eó2qno'fæó2hl Aæ2 hl óT'æó2,2006fo .62Gr 62 Ti r 22222 ue2xÀ2r'E ó2ue2q u 2dFh,2222l ue.eq. .,22l .ltd sT 22982,2

2 22ql r. 2F q'G2Fr 2hl óT'æ2B989t à2ue2æq.l d22u2ux2o ó. ó x22222 2ed27Fieq. u 2 2d àí ó2ue2q ruFq.eh r qdey. T22 2l .l óF 222222E c Frl ql c he.er.ó,2262à r 66 qd2Tq d2eó2 r'E ó27Fieq. 22 r 6E d2ql c 26á 2ueó2qT 2r.edí dc er.,2262à 2d l A d2Fr 2d r6uFqq'G2 tered ó'E u 2ue2h2r qdeé22 22Teó2ue26 27Fieqq'G26er. 26 2d r6uFqq'G2 2qno'fæó2 qF d62 hnd BTc u c er. 2015 2777Fd 26/2222S,22r q d 2z Fe2eó2qno'fæó2222202eó2à r 2deuF'22ue2 c red 26Tr 2Tq .2à 2 r. 2 ó2912ql c 2 ó2/81 Teó2hl ó.edí d62 2 27Fieqq'G26ec Ao à 2z Fe2 d Freó2ue2eó2qno'fæó2hl óT'æó2er q d 2662 r.er Ter 27Fó2 ó2/81 Teó2et (er.ó,22c A22 ó2 ue2hd c l.l d2eó. ó 2l c íó262 2d l A d2Fr 26d .2c A2Fr 2qno'fo 2ul Aæ2hl óT'æ 2hed22222 27FóFóF 2777Fd 26/22Se. 2z Fe2ql r ql du à 2c A26 2A 2B 2q .2á z Feó. 2hd c l.l d2 2eó2 qno'fæó2er ul qdF eó222c er e22 22689922d F6e2 2269 KK/S,22 27Fó2 d q'G2c sl qg Tq 262à 2 ue.eq. d2hdF q'2æ er. 2er 2eó2h2r qdeé2ueó2d .l óF 62 ó2912u Teó2hedC2 c Aí 2eó2à r 2



3.1.1. Histology of the Pancreas
 The pancreas is a large, elongated, glandular organ. It is divided into three main regions: the head, the body, and the tail. The head is the largest part and is located near the duodenum. The body is the middle part, and the tail is the smallest part, located at the far end. The pancreas is composed of two types of tissue: exocrine and endocrine. The exocrine tissue is responsible for the production and secretion of pancreatic juice, which contains enzymes that help in the digestion of food. The endocrine tissue is responsible for the production and secretion of hormones, such as insulin and glucagon, which help in the regulation of blood sugar levels.

The exocrine tissue of the pancreas is organized into acini, which are small, pyramid-shaped cells. Each acinus is surrounded by a thin layer of connective tissue. The acini are arranged in a way that they all drain into a common duct, the main pancreatic duct. The endocrine tissue of the pancreas is organized into islets of Langerhans, which are small, rounded clusters of cells. Each islet is surrounded by a thin layer of connective tissue. The islets are scattered throughout the pancreas, and each islet contains a mixture of different types of endocrine cells.

3.1.2. Histology of the Liver
 The liver is a large, reddish-brown organ. It is divided into two main lobes: the right lobe and the left lobe. The liver is composed of two types of tissue: hepatocytes and sinusoids. The hepatocytes are the main cells of the liver, and they are responsible for the production and secretion of bile. The sinusoids are small, irregular spaces between the hepatocytes, and they are responsible for the transport of blood and nutrients. The liver is also composed of connective tissue, which forms the framework of the organ.

The liver is a highly vascularized organ, and it receives blood from two sources: the hepatic portal vein and the hepatic artery. The hepatic portal vein carries blood from the gastrointestinal tract to the liver, and the hepatic artery carries oxygenated blood from the heart to the liver. The liver is also highly regenerative, and it can regenerate itself after being damaged. The liver is a vital organ, and it plays a central role in many of the body's metabolic processes.

Com a conclusió, en aquesta part del treball hem estat capaços de transduir el pàncrees endocrí i exocrí *in vivo* mitjançant l'administració dels vectors HdAd per via intraductal. Aquestes dades demostren que els HdAd es podrien utilitzar per a la transferència gènica a pàncrees de gens claus tant per a aproximacions de teràpia gènica pel tractament de la diabetis mellitus, com pel tractament de pancreatitis crònica o fins i tot en casos de càncer de pàncrees.

***Part III: Transducció al pàncrees exocrí
mitjançant vectors AAV***

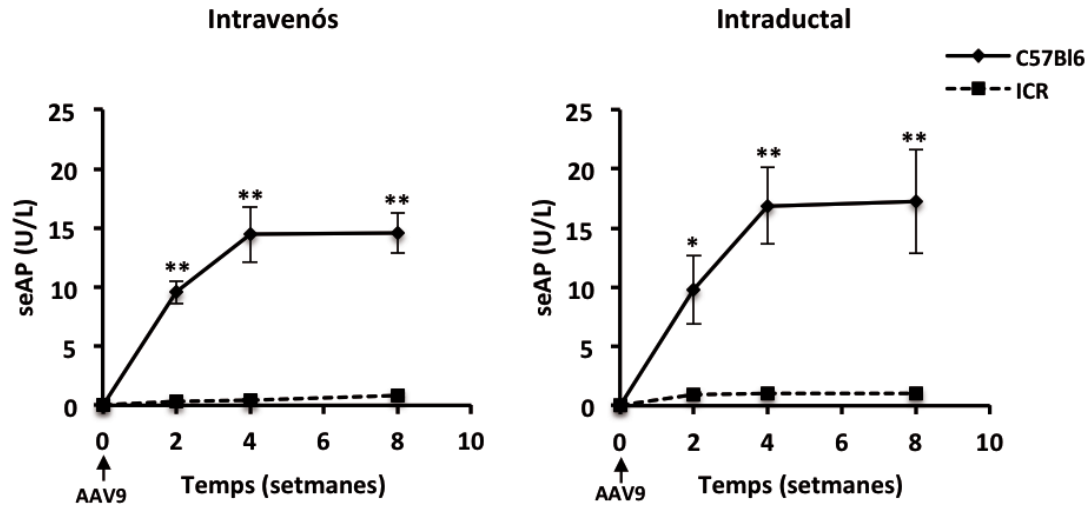


Fig. 3. Intravenous and intraductal administration of AAV9-Cre to C57Bl6 and ICR mice. Mice were infected with AAV9-Cre at 0 weeks and sacrificed at 2, 4, and 8 weeks. Serum samples were collected and analyzed for seAP levels. C57Bl6 mice showed significantly higher seAP levels compared to ICR mice at all time points. Statistical significance is indicated by asterisks (* p < 0.05, ** p < 0.01).

?

Fig. 4. Intravenous and intraductal administration of AAV9-Cre to C57Bl6 and ICR mice. Mice were infected with AAV9-Cre at 0 weeks and sacrificed at 2, 4, and 8 weeks. Liver samples were collected and analyzed for seAP levels. C57Bl6 mice showed significantly higher seAP levels compared to ICR mice at all time points. Statistical significance is indicated by asterisks (* p < 0.05, ** p < 0.01).

?

?

3.2. Transdiferenciació del pàncrees exocrí en cèl·lules productores d'insulina mitjançant vectors AAV.

La regeneració de cèl·lules β *in vivo* ha esdevingut un mètode prometedor per al tractament de la diabetis tipus 1. Diversos grups han demostrat la regeneració de cèl·lules productores d'insulina a partir de diferents models cel·lulars. A més a més han demostrat la diferenciació de cèl·lules acinars del pàncrees cap a un fenotip beta *in vivo* quan els animals eren tractats amb la combinació de tres factors de transcripció implicats en el desenvolupament de la cèl·lula β i en la producció de la insulina; *Pdx1* (*Pancreas and duodenal homeobox gene-1*), *Neurog3* (*Neurogenin 3*) i *MafA* (PNM) mitjançant Adenovirus (Ad) en animals immunodeprimits (Akinci *et al.*, 2012; Banga *et al.*, 2012; Banga *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2008). Estudis *in vitro* mostren l'evidència d'un possible *reprogramming*, tot i no ser complet, de cèl·lules exocrines de rata (AR42j-B13) en cèl·lules productores d'insulina amb un Ad-PNM (*Pdx1*, *Ngn3* i *MafA*) (Akinci *et al.*, 2012). Per altra banda, l'expressió ectòpica d'aquests tres factors al fetge a través Ad són capaços de revertir la hiperglucèmia en ratolins diabètics NOD-SCID (Banga *et al.*, 2012).

En aquesta part del treball ens vàrem proposar transdiferenciar específicament les cèl·lules exocrines del pàncrees en cèl·lules productores d'insulina *in vivo* per mitjà dels factors de transcripció *Pdx-1*, *Neurog3* i *MafA*. Nosaltres vàrem utilitzar vectors virals Adenoassociats de serotip 9 (AAV9) i animals immunocompetents, a diferència d'altres estudis on utilitzen animals immunodeprimits i Adenovirus de primera generació (FGAd) els quals generen una elevada resposta immunogènica.

Donat els nostres resultats observats anteriorment en la transducció del pàncrees exocrí mitjançant AAV, en el disseny experimental es van utilitzar ratolins C57Bl6 i la injecció local dels vectors virals al pàncrees per via intraductal retrògrada.

3.2.1. Generació dels constructes i dels vectors virals AAV9.

Amb l'objectiu d'expressar els factors de transcripció esmentats específicament a les cèl·lules exocrines del pàncrees, es van generar els diferents vectors virals AAV9 independents amb els factors de transcripció *Pdx-1*, *Neurog3* i *MafA* sota el control del promotor ElastasaI (-205/+ 8) (Kruse *et al.*, 1993; *et al.*, 1995); vectors anomenats AAV9-PNM.

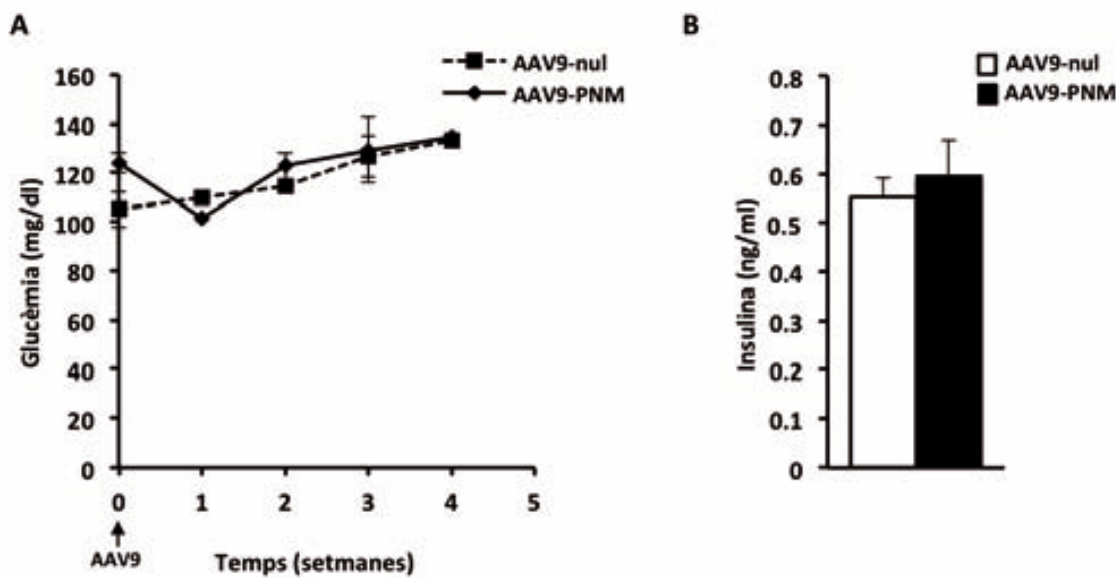


Fig. 1. Glucose and insulin levels in AAV9-treated mice. **A**, Glucose levels (mg/dl) were measured at 0, 1, 2, 3, and 4 weeks after AAV9 injection. **B**, Insulin levels (ng/ml) were measured at 4 weeks after AAV9 injection. Data are mean ± SEM. *p < 0.05.

□

6. Results

6.1. AAV9 treatment of mice with type 1 diabetes mellitus. Mice with type 1 diabetes mellitus were treated with AAV9-nul or AAV9-PNM. The AAV9-PNM group showed significantly lower glucose levels and higher insulin levels compared to the AAV9-nul group at 4 weeks post-treatment.

6.2. Effect of AAV9-PNM on glucose and insulin levels. The AAV9-PNM group showed a significant decrease in glucose levels and a significant increase in insulin levels compared to the AAV9-nul group at 4 weeks post-treatment.

6.3. Effect of AAV9-PNM on body weight and food intake. There were no significant differences in body weight or food intake between the AAV9-nul and AAV9-PNM groups at 4 weeks post-treatment.

□

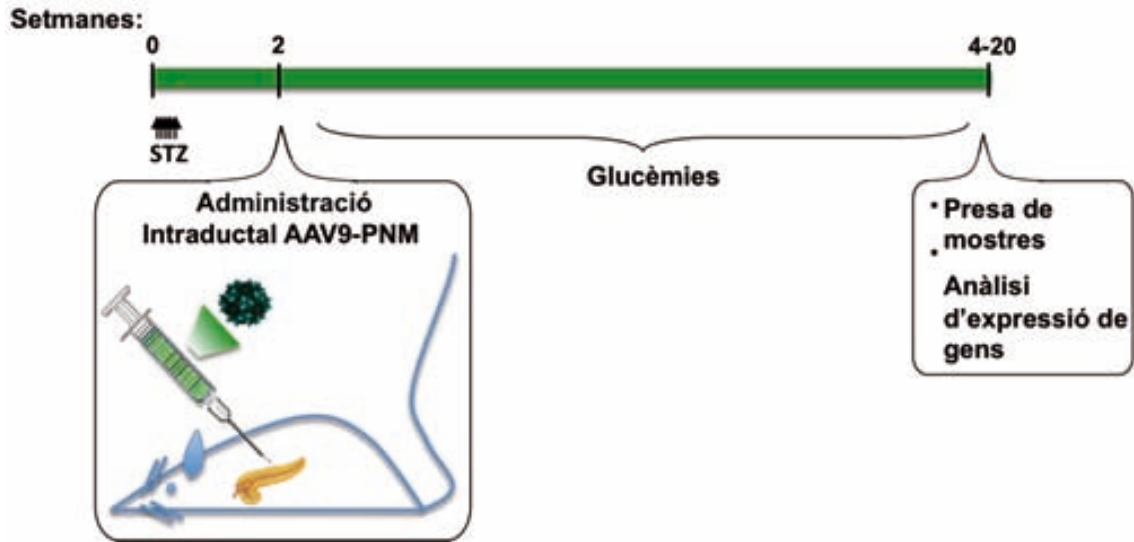


Fig. 1 Esquema del disseny experimental. Els ratollets van ser tractats amb STZ a la setmana 0 i administrats amb AAV9-PNM a la setmana 2. Les glucèmies es van mesurar i les mostres es van prendre a les setmanes 4–20 per a l'anàlisi d'expressió de gens

Fig. 1

El nostre treball demostra que la infecció per AAV9-PNM en ratollets diabètics pot revertir parcialment el defecte de secreció d'insulina i millorar el control glicèmic. A més, l'administració d'AAV9-PNM a ratollets diabètics pot revertir parcialment el defecte de secreció d'insulina i millorar el control glicèmic. A més, l'administració d'AAV9-PNM a ratollets diabètics pot revertir parcialment el defecte de secreció d'insulina i millorar el control glicèmic.

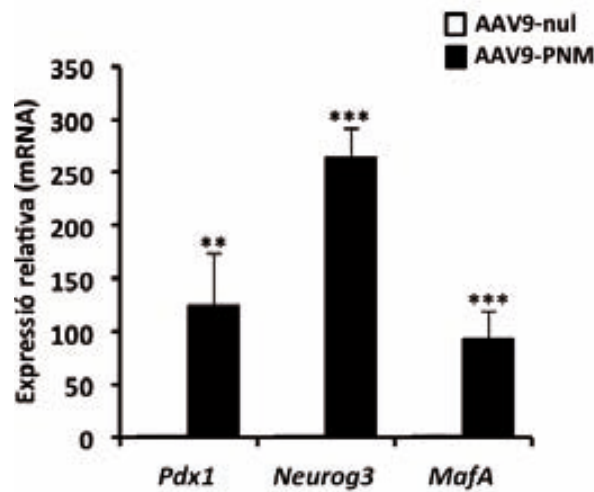
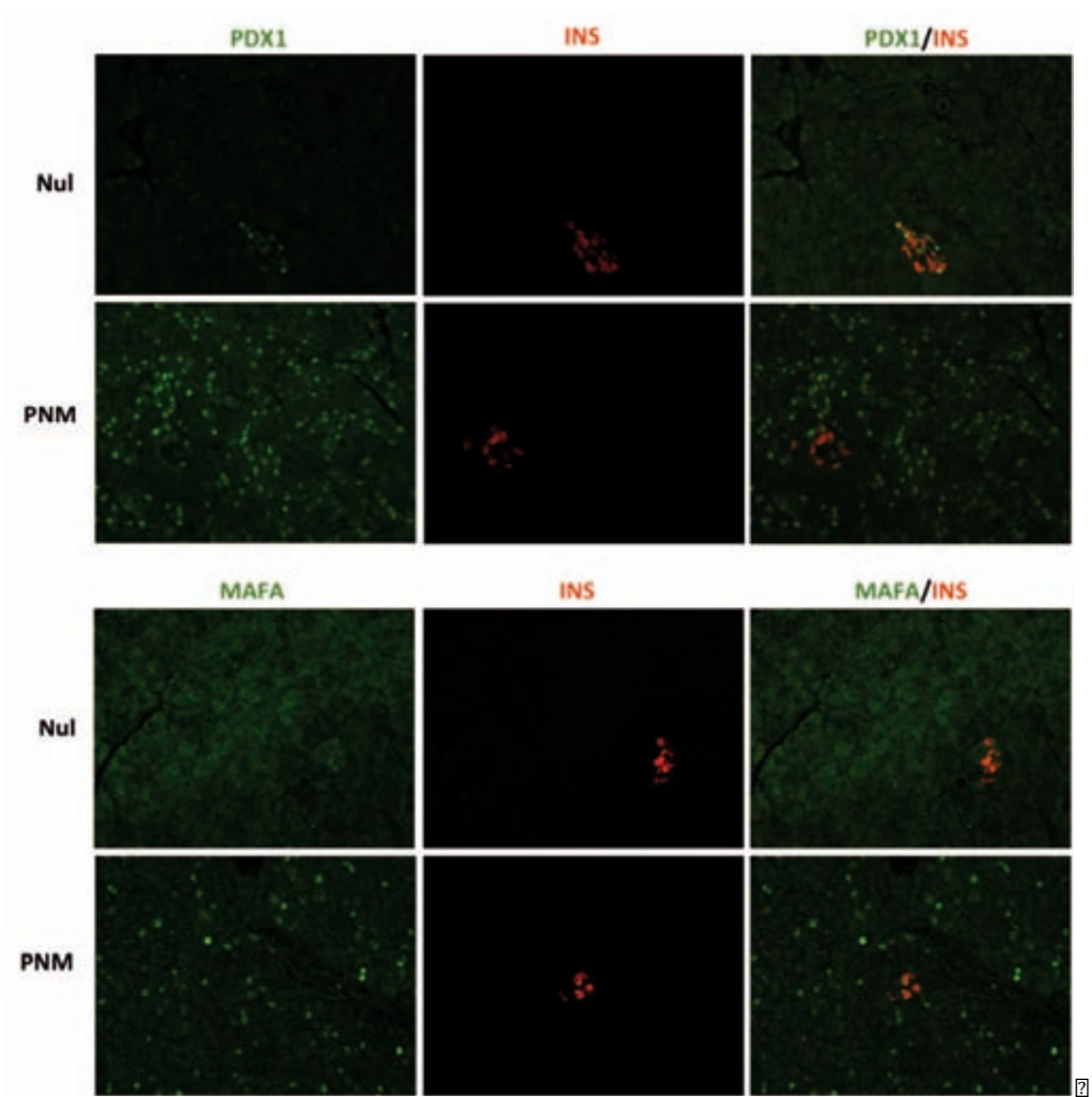


Fig. 2 Expressió relativa de mRNA de *Pdx1*, *Neurog3* i *MafA* en ratollets diabètics administrats amb AAV9-PNM o AAV9-nul. Els ratollets van ser sacrificats a la setmana 20. Els nivells de mRNA es van mesurar mitjançant qPCR i es van normalitzar respecte a *Hprt*. Els nivells de mRNA de *Pdx1* i *Neurog3* van ser significativament més alts en els ratollets administrats amb AAV9-PNM que en els ratollets administrats amb AAV9-nul (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Els nivells de mRNA de *MafA* van ser significativament més baixos en els ratollets administrats amb AAV9-PNM que en els ratollets administrats amb AAV9-nul (*** $p < 0.001$)

Fig. 2

Fig. 2

The data shows that the number of cases of COVID-19 in the region has increased significantly since the beginning of the year. This is due to the fact that the virus is highly contagious and has spread rapidly among the population. The number of cases is expected to continue to rise in the coming months.



The data shows that the number of cases of COVID-19 in the region has increased significantly since the beginning of the year. This is due to the fact that the virus is highly contagious and has spread rapidly among the population. The number of cases is expected to continue to rise in the coming months.

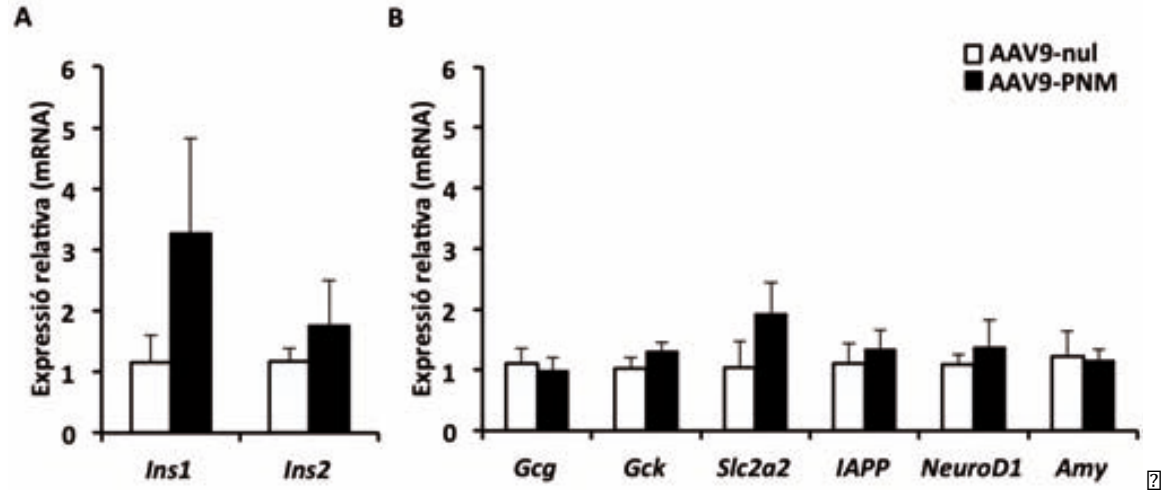
2

The data shows that the number of cases of COVID-19 in the region has increased significantly since the beginning of the year. This is due to the fact that the virus is highly contagious and has spread rapidly among the population. The number of cases is expected to continue to rise in the coming months.

2

El present treball descriu els efectes de la delecció de *Ins1* i *Ins2* en el desenvolupament i la funció de les cèl·lules beta pancreàtiques. Els animals *Ins1*^{-/-} i *Ins2*^{-/-} desenvolupen una hipoglucèmia severa i morren abans dels 10 dies d'edat. Els animals *Ins1*^{-/-} *Ins2*^{-/-} desenvolupen una hipoglucèmia més lleu i sobreviuen fins als 30 dies d'edat. Aquests resultats indiquen que *Ins1* i *Ins2* són importants per a la supervivència i el desenvolupament de les cèl·lules beta pancreàtiques.

?



El present treball descriu els efectes de la delecció de *Ins1* i *Ins2* en el desenvolupament i la funció de les cèl·lules beta pancreàtiques. Els animals *Ins1*^{-/-} i *Ins2*^{-/-} desenvolupen una hipoglucèmia severa i morren abans dels 10 dies d'edat. Els animals *Ins1*^{-/-} *Ins2*^{-/-} desenvolupen una hipoglucèmia més lleu i sobreviuen fins als 30 dies d'edat. Aquests resultats indiquen que *Ins1* i *Ins2* són importants per a la supervivència i el desenvolupament de les cèl·lules beta pancreàtiques.

?

?

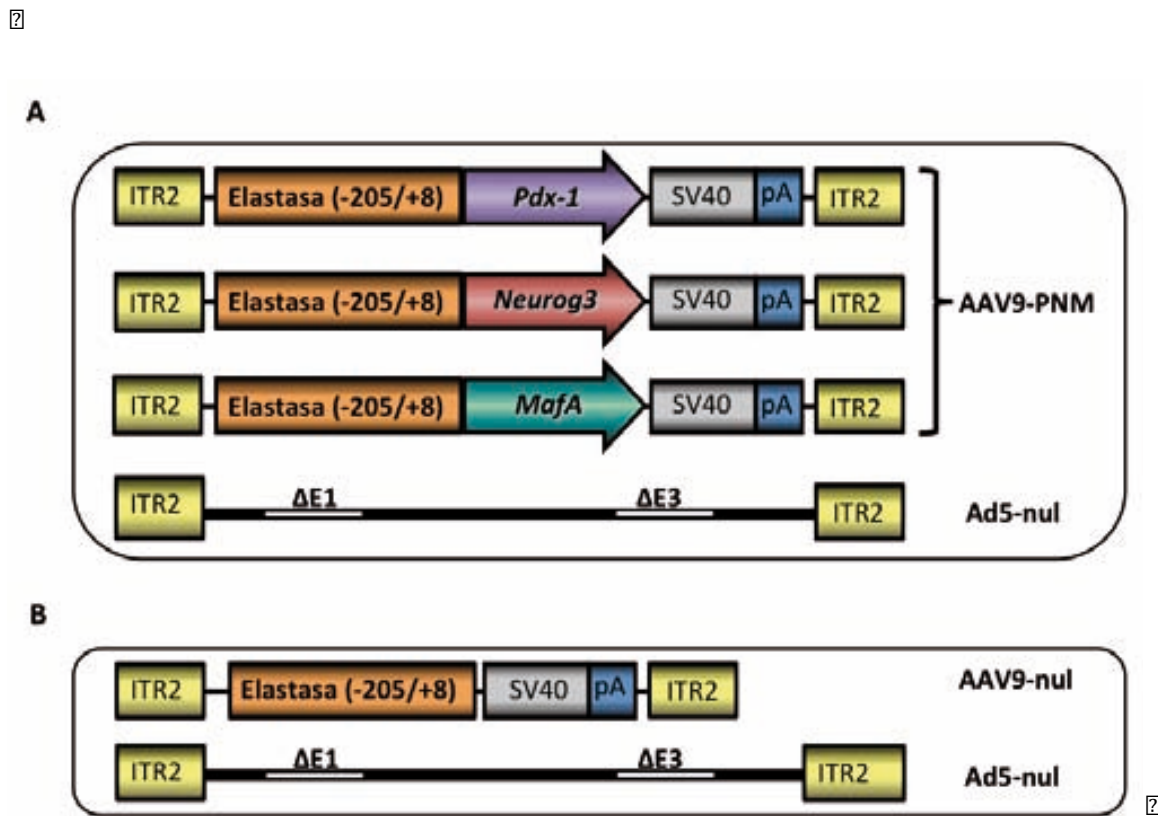
El present treball descriu els efectes de la delecció de *Ins1* i *Ins2* en el desenvolupament i la funció de les cèl·lules beta pancreàtiques. Els animals *Ins1*^{-/-} i *Ins2*^{-/-} desenvolupen una hipoglucèmia severa i morren abans dels 10 dies d'edat. Els animals *Ins1*^{-/-} *Ins2*^{-/-} desenvolupen una hipoglucèmia més lleu i sobreviuen fins als 30 dies d'edat. Aquests resultats indiquen que *Ins1* i *Ins2* són importants per a la supervivència i el desenvolupament de les cèl·lules beta pancreàtiques.

?

?

?

The AAV9 vector is a serotype that is highly tropic for neurons. It is derived from the AAV9 genome, which is a member of the *Parvoviridae* family. The AAV9 genome consists of two terminal (ITR1 and ITR2) and two internal (I1 and I2) inverted terminal repeats. The ITR2 repeat is the primary site for packaging of the viral genome. The AAV9 genome is flanked by the ITR2 repeats and contains the 5' and 3' terminal repeats (ITR1 and ITR2) and the internal repeats (I1 and I2). The AAV9 genome is packaged into a non-enveloped, icosahedral capsid. The AAV9 capsid is composed of six capsid proteins (VP1, VP2, and VP3) and is approximately 26 nm in diameter. The AAV9 genome is packaged into the capsid and is released from the host cell. The AAV9 genome is highly stable and can persist in the environment for long periods of time. The AAV9 genome is highly infectious and can infect a wide range of cell types, including neurons. The AAV9 genome is highly tropic for neurons and is the most efficient serotype for neuronal transduction. The AAV9 genome is highly stable and can persist in the environment for long periods of time. The AAV9 genome is highly infectious and can infect a wide range of cell types, including neurons. The AAV9 genome is highly tropic for neurons and is the most efficient serotype for neuronal transduction.



The AAV9 genome is highly stable and can persist in the environment for long periods of time. The AAV9 genome is highly infectious and can infect a wide range of cell types, including neurons. The AAV9 genome is highly tropic for neurons and is the most efficient serotype for neuronal transduction. The AAV9 genome is highly stable and can persist in the environment for long periods of time. The AAV9 genome is highly infectious and can infect a wide range of cell types, including neurons. The AAV9 genome is highly tropic for neurons and is the most efficient serotype for neuronal transduction.

The AAV9 genome is highly stable and can persist in the environment for long periods of time. The AAV9 genome is highly infectious and can infect a wide range of cell types, including neurons. The AAV9 genome is highly tropic for neurons and is the most efficient serotype for neuronal transduction.

The AAV9 genome is highly stable and can persist in the environment for long periods of time. The AAV9 genome is highly infectious and can infect a wide range of cell types, including neurons. The AAV9 genome is highly tropic for neurons and is the most efficient serotype for neuronal transduction.

The AAV9 genome is highly stable and can persist in the environment for long periods of time. The AAV9 genome is highly infectious and can infect a wide range of cell types, including neurons. The AAV9 genome is highly tropic for neurons and is the most efficient serotype for neuronal transduction.

Fig. 1. Effect of AAV9 on glucose tolerance test (GTT) and insulin levels in STZ-induced diabetic mice. Mice were divided into four groups: AAV9-nul + Ad5-nul (n=10), AAV9-PNM + Ad5-nul (n=10), AAV9-nul + Ad5-PNM (n=10), and AAV9-PNM + Ad5-PNM (n=10). All mice were treated with STZ (50 mg/kg) and AAV9 (10¹⁰ particles) at 2 weeks of age. Glucose levels (mg/dl) were measured at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, and 20 weeks. Insulin levels (ng/ml) were measured at 10 weeks. Data are shown as mean ± SEM. * p < 0.05 vs. AAV9-nul + Ad5-nul group.

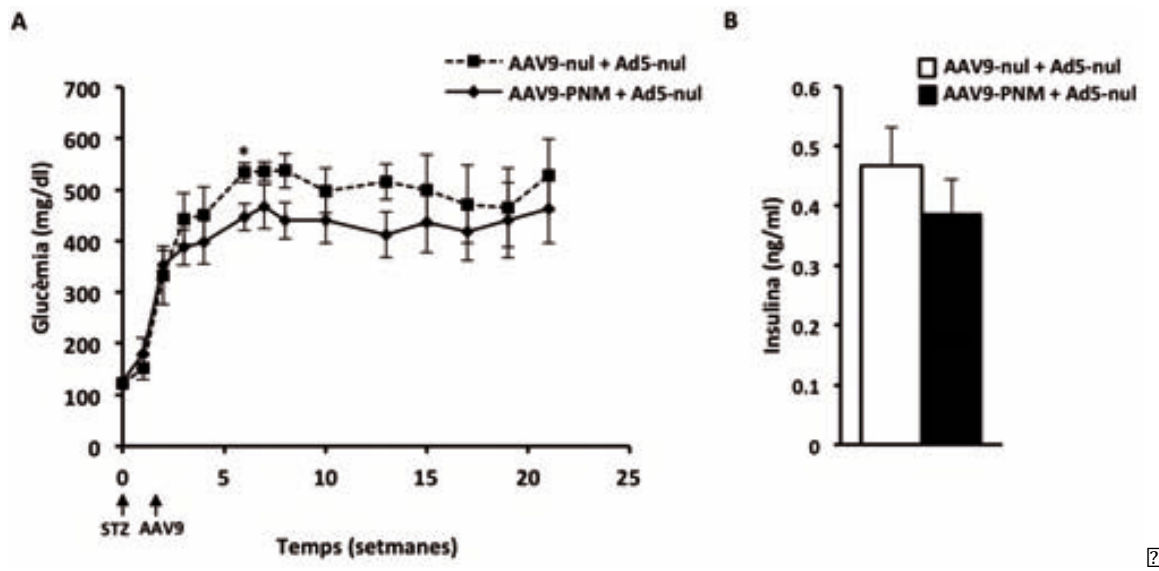


Fig. 1. Effect of AAV9 on glucose tolerance test (GTT) and insulin levels in STZ-induced diabetic mice. Mice were divided into four groups: AAV9-nul + Ad5-nul (n=10), AAV9-PNM + Ad5-nul (n=10), AAV9-nul + Ad5-PNM (n=10), and AAV9-PNM + Ad5-PNM (n=10). All mice were treated with STZ (50 mg/kg) and AAV9 (10¹⁰ particles) at 2 weeks of age. Glucose levels (mg/dl) were measured at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, and 20 weeks. Insulin levels (ng/ml) were measured at 10 weeks. Data are shown as mean ± SEM. * p < 0.05 vs. AAV9-nul + Ad5-nul group.

Fig. 2. Effect of AAV9 on body weight and food intake in STZ-induced diabetic mice. Mice were divided into four groups: AAV9-nul + Ad5-nul (n=10), AAV9-PNM + Ad5-nul (n=10), AAV9-nul + Ad5-PNM (n=10), and AAV9-PNM + Ad5-PNM (n=10). All mice were treated with STZ (50 mg/kg) and AAV9 (10¹⁰ particles) at 2 weeks of age. Body weight (g) and food intake (g) were measured at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, and 20 weeks. Data are shown as mean ± SEM. * p < 0.05 vs. AAV9-nul + Ad5-nul group.

Fig. 3. Effect of AAV9 on pancreatic islet morphology in STZ-induced diabetic mice. Mice were divided into four groups: AAV9-nul + Ad5-nul (n=10), AAV9-PNM + Ad5-nul (n=10), AAV9-nul + Ad5-PNM (n=10), and AAV9-PNM + Ad5-PNM (n=10). All mice were treated with STZ (50 mg/kg) and AAV9 (10¹⁰ particles) at 2 weeks of age. Pancreatic islets were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed by light microscopy. Data are shown as mean ± SEM. * p < 0.05 vs. AAV9-nul + Ad5-nul group.

V. DISCUSSIÓ

Actualment la Diabetis Mellitus és una de les malalties més comunes. Existeixen varis tipus de diabetis mellitus: la diabetis tipus 1, resultat de la destrucció autoimmunitària progressiva de les cèl·lules β pancreàtiques, i la diabetis tipus 2 la qual es deguda normalment a una resistència a la insulina dels teixits perifèrics. Finalment, tant a la diabetis tipus 1 com a la tipus 2 es produeix la reducció de la massa de cèl·lules β , però els símptomes clínics no es manifesten fins que aquesta s'ha reduït el 80%. Per tant, seria interessant buscar noves teràpies per poder augmentar la massa de cèl·lula β i així minimitzar els efectes de la malaltia.

Amb l'objectiu de regenerar les cèl·lules β s'han avaluat diferents factors de creixement com el IGF-I (Agudo *et al.*, 2008) o HGF (Garcia-Ocana *et al.*, 2000; Garcia-Ocana *et al.*, 2001; Jimenez *et al.*, 2011) així com la combinació de diferents factors de transcripció: Pdx1, Neurog3 i MafA (Akinci *et al.*, 2012; Banga *et al.*, 2012; Banga *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2008). La gran majoria dels estudis són realitzats a punt final, un cop sacrificat l'animal, i no permeten fer un seguiment dels canvis en la massa de cèl·lula β ni de les cèl·lules acinars, la qual ens reflexen els possibles efectes del tractament. Per tant, seria de gran interès desenvolupar noves aproximacions per a l'anàlisi de la massa de cèl·lula β i de les cèl·lules acinars mentre l'animal roman viu. Amb aquesta finalitat, s'han desenvolupat tres estratègies que permeten avaluar les cèl·lules β i acinars del pàncrees durant un període llarg de temps. S'han generat ratolins transgènics RIPI/ β -Gal i vectors virals HdAd i AAVs.

En primer lloc, s'ha generat un animal transgènic que expressa el gen de la β -Gal sota el promotor d'insulina de rata (RIP-I), promotor específic de les cèl·lules β . Es van amplificar 3 línies d'animals transgènics les quals presentaven cadascuna d'elles un nombre de còpies del transgèn diferent. Només la L5, que era la de menor nombre de còpies, presentava un 90% de cèl·lules doble positives per Insulina i β -Gal a les 12 setmanes d'edat. Mentre que la L4, d'un nombre semblant de còpies a la L5, i la L3 amb elevat nombre de còpies del transgèn presentaven una molt baixa expressió de la β -Gal als pàncrees dels animals transgènics a la mateixa edat. Aquestes diferències d'expressió podrien ser degudes a una possible toxicitat de la β -Gal a les cèl·lules β . Les nostres dades demostren que l'elevada expressió del transgèn no influeix en la distribució de les cèl·lules de l'illot ni en la resposta a una sobre-càrrega de glucosa, reflectint una normalitat en els ratolins transgènics.

Les diferències d'expressió d'un transgèn en el context de ratolins transgènics, poden ser degudes a múltiples factors com el silenciament per mecanismes epigenètics, el nombre de còpies, el lloc d'integració i el fons genètic de l'animal generat (Graubert *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1996; Whitelaw *et al.*, 2001). A més a més, s'ha descrit que amb l'edat l'expressió del transgèn es pot veure reduïda (Robertson *et al.*, 1996).

L'anàlisi dels animals a diferents edats indicava que les diferències d'expressió no eren degudes al silenciament durant la vida del ratolí, ja que al primer punt del nostre estudi (3 setmanes) les diferències en el nombre de cèl·lules doble positives ja era evident i no es va observar una disminució de l'expressió de la β -Gal a cap de les línies estudiades al llarg del temps. Aquest resultat indica que el silenciament observat es produeix en etapes molt properes del naixement o, inclús, més probablement en etapes del desenvolupament embrionària, tal i com s'ha descrit en altres animals transgènics que expressen el gen LacZ (Montoliu *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 1996; Whitelaw *et al.*, 2001).

Per altra banda, està descrit que en molts casos els nivells d'expressió del transgèn no es correlacionen amb el nombre de còpies integrades al genoma. Quan el transgèn s'integra al genoma del ratolí o d'altres organismes en les regions properes als telòmers o en les regions centromèriques es pot produir una expressió heterocel·lular del transgèn expressant-se en unes cèl·lules i en altres no. Aquest fenomen s'anomena expressió dependent de la posició o variegància, on es pot observar variabilitat d'expressió entre els diferents llocs d'integració del genoma sense haver cap relació amb el nombre de còpies del transgèn. Els efectes en la posició d'integració poden estar relacionats amb la presència d'elements reguladors de la cromatina al voltant del lloc de la integració com, per exemple, d'*enhancers* els quals augmentarien l'expressió del transgèn independentment del nombre de còpies (Dobie *et al.*, 1997; Graubert *et al.*, 1998; Guy *et al.*, 1997; Sutherland *et al.*, 1997; Whitelaw *et al.*, 2001).

Altres estudis demostren que com més gran és el nombre de còpies del transgèn, hi ha una tendència que aquest sigui transcripcionalment menys actiu (Mehtali *et al.*, 1990). Estudis amb ratolins transgènics amb el sistema de recombinació Cre/loxP aconseguen la integració del transgèn β -Globina/*lacZ* a la mateixa regió però amb diferent nombre de còpies. L'anàlisi d'expressió d'aquests ratolins posava de manifest que les línies amb menor nombre de còpies presentaven major expressió del transgèn i una reducció de la variegància (major nombre de cèl·lules expressaven el transgèn). Aquests resultats s'explicaven per una disminució en els nivells de metilació i una millor accessibilitat de la

cromatina al locus suggerint el silenciament del transgèn quan aquest estava en múltiples repeticions (Garrick *et al.*, 1998).

Totes aquestes dades podien explicar els nostres resultats observats. La línia que presentava menor nombre de còpies, la L5, presentava un 90% d'expressió de la β -Gal als illots pancreàtics, mentre que la L3 de major nombre de còpies presentaven una menor expressió; en aquest cas el nombre de còpies integrades al genoma influiria en el nombre de cèl·lules que expressen el transgèn. En canvi, al comparar la L4 i la L5, totes dues d'un nombre de còpies semblant, obteníem diferències estadísticament significatives en l'expressió de la β -Gal, fet que podria ser degut al diferent lloc d'integració del transgèn que causaria aquestes diferències. Tot i haver diferències en el nombre de cèl·lules que expressen el transgèn observades en cada línia estudiada, la quantitat d'expressió de la β -Gal per cada una d'aquestes cèl·lules positives podria ser diferent.

Estudis previs demostraven una bona correlació entre cèl·lules tumorals i també en cèl·lules de pulmó que expressen la β -Gal, i la fluorescència generada pel producte de la reacció quan s'utilitzava el substrat fluorescent DDAO (Josserand *et al.*, 2007).

Per tant, de les línies obtingudes, només la L5, que presenta el 90% d'expressió de la β -Gal, podria ser útil per a l'estudi del desenvolupament de les cèl·lules β des de l'estadi embrionari fins a l'estadi adult. Així com també, aquest model permetria estudiar la distribució tridimensional dels illots al pàncrees i quantificar la massa de cèl·lula β durant diferents estadis de la diabetis.

A diferència dels animals transgènics, l'ús de vectors virals permet l'elecció del moment, la via d'administració, la dosi administrada, així com també el teixit diana on expressar el transgèn segons el promotor utilitzat. L'administració del vector viral durant l'etapa adulta de l'animal elimina les possibles interaccions derivades de l'efecte del transgèn durant el desenvolupament embrionari. Depenent del vector viral utilitzat, el transgèn es manté de forma episomal i per tant, l'expressió no depèn del lloc d'integració del constructe i normalment els nivells d'expressió es correlacionen amb la dosi administrada. Per tant, els vectors virals ens permeten analitzar animals amb diferents nivells d'expressió del transgèn segons la dosi administrada, mentre que en els animals transgènics convencionals l'estudi de nivells d'expressió diferent requereixen la generació de diverses línies de transgènics. Un altre avantatge respecte els animals transgènics és que el mateix vector viral pot ser avaluat en diferents models animals i, fins i tot, en animals grans com els gossos (Ayuso *et al.*, 2006; Callejas *et al.*, 2013) o primats (Gray *et al.*, 2013; Samaranch *et al.*, 2013). També s'ha de tenir en compte que la utilització de

vectors virals redueix el nombre d'animals i el temps necessari per a l'estudi en comparació amb la generació d'animals transgènics.

Per tant, una bona alternativa als animals transgènics RIP-I/ β -Gal seria l'ús de vectors virals que expressen gens reporters com el GFP i la Fosfatasa Alcalina (seAP).

S'ha demostrat que mitjançant la transferència gènica amb vectors virals podem transduir amb eficiència el teixit diana escollit, en el nostre cas el pàncrees (Ayuso *et al.*, 2004; Ayuso *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2011). Així es van generar vectors virals HdAd i AAV que expressaven els gens reporters GFP i/o seAP sota el control de promotors pancreàtics.

Per evitar els efectes negatius d'una administració directa al parènquima pancreàtic en els animals immunocompetents, es va utilitzar la injecció intraductal dels vectors virals, que en el cas dels AAV resulta en un elevat percentatge de transducció i un bon perfil de seguretat (Jimenez *et al.*, 2011). La injecció retrograda pel ducte pancreàtic és una adaptació de la tècnica clínica anomenada colangiopancreatografia endoscòpica retrògrada (ERCP). La tècnica ERCP s'utilitza amb freqüència en humans i per tant, la injecció retrògrada pot aportar avantatges en assaigs de futures aproximacions de teràpia gènica dirigides al pàncrees de pacients diabètics. No obstant, aquesta tècnica no és innòcua i entre un 3 i un 40% dels pacients poden desenvolupar pancreatitis després de la ERCP (Balmadrid *et al.*, 2013; Freeman *et al.*, 2001).

Estudis de teràpia gènica utilitzant HdAd dirigits al fetge i al cervell mostren resultats prometedors en diferents malalties com l'hemofília B (Brunetti-Pierri *et al.*, 2012; Brunetti-Pierri *et al.*, 2009; *et al.*, 2011), per Hiperbilirubinèmia (Dimmock *et al.*, 2011), per la glucogenosi tipus 1a (Crane *et al.*, 2012) i el Glioblastoma (Muhammad *et al.*, 2010). Per tant, els HdAd podrien ser una bona alternativa per a la transferència de gens al pàncrees. Estudis previs en ratolins han demostrat que els vectors adenovirals de primera generació (FGAd) són capaços de transduir el pàncrees quan la circulació hepàtica és bloquejada (Ayuso *et al.*, 2004) o quan son administrats a gossos amb els vasos pancreàtics clampats (Ayuso *et al.*, 2006). A més a més, s'ha descrit la transducció del pàncrees amb els vectors FGAd i vectors oncolítics quan són administrats per via intraductal a través del ducte biliar comú (Jose *et al.*, 2013).

Per tant, el nostre primer objectiu era avaluar la transducció del pàncrees a partir de la injecció intraductal dels vectors virals HdAd, els quals permeten una major capacitat

de clonatge (fins a 37kb) i són menys immunogènics que la resta dels Adenovirus existents.

Quan es van injectar els vectors HdAd-CMV-GFP només el 3% de cèl·lules exocrines i un 1% de cèl·lules β eren GFP positives, sent aquesta eficiència significativament inferior quan es comparava amb els AAV (Jimenez *et al.*, 2011). Una forma d'augmentar l'eficiència de transducció podria ser a través d'un augment de la dosi viral administrada, fet que s'ha observat amb els AAV. L'obtenció de preparacions de HdAd altament concentrades no és tant fàcil com en els AAV, tot i que existeixen noves tecnologies que ho fan factible (Palmer *et al.*, 2003; Palmer *et al.*, 2008). A més l'ús d'elevades dosis de HdAd comporta un problema per a l'animal ja que pot provocar una resposta immune innata i una toxicitat aguda que pot acabar causant la mort (Brunetti-Pierri *et al.*, 2004). Aquest problema es deu principalment a la transducció del fetge i de la melsa causada per l'activació dels macròfags. No obstant, nosaltres no hem observat transducció al fetge ni detectat signes d'infiltració limfocitària quan els vectors HdAd van ser administrats per via intraductal quan s'utilitzava un promotor específic (hIns), posant de manifest una reducció de la seva toxicitat i la possibilitat d'utilitzar dosis virals de HdAd més altes al pàncrees respecte a les utilitzades fins l'actualitat de forma intravenosa.

Un dels avantatges dels vectors HdAd és la capacitat de transduir el teixit diana durant un llarg període de temps en animals immunocompetents. No obstant, l'expressió de GFP als pàncrees dels animals injectats amb HdAd-CMV-GFP va desaparèixer després de 5 dies de la injecció desapareixia observant-se una elevada infiltració limfocitària tot i no veure's afectada la funcionalitat pancreàtica. Aquesta resposta immunitària va desaparèixer als 30 dies de la injecció quan l'expressió del transgèn GFP ja havia desaparegut. Aquestes dades indicaven que la infiltració limfocitària era provocada pel transgèn GFP, probablement causada per la seva expressió a les cèl·lules presentadores d'antigen com a conseqüència de la utilització del promotor ubic CMV. Estudis existents demostren que els HdAd són capaços de promoure la resposta immune, tant humoral com cel·lular, tot i l'absència de seqüències adenovirals. Per tant, la resposta immune seria deguda principalment al transgèn i no al vector viral. L'expressió del transgèn i la proteïna produïda són capaços d'estimular la resposta immune a través dels limfòcits T citotòxics (CTL) provocant l'eliminació de les cèl·lules que expressen el transgèn o a través de la resposta humoral produint anticossos en contra d'aquest (Weaver *et al.*, 2009).

Els resultats observats són coherents amb la literatura. Estudis en ratolins els quals se'ls hi administrava un vector que codificava per una proteïna no murina

mostraven un increment en la respostes immunològica, i a més a més, s'ha demostrat que aquesta resposta immune humoral és més important contra el transgèn que respecte les proteïnes virals (Tripathy *et al.*, 1996). De la mateixa manera, l'expressió de la β -Gal al múscul esquelètic de ratolins immunocompetents a través de vectors HdAd van induir una disminució del nombre de còpies del vector i la pèrdua completa de l'expressió de la β -Gal (Chen *et al.*, 1997). Aquests ratolins mostraven una extensa infiltració limfocitària, principalment limfòcits CD4⁺ i CD8⁺ associada a l'expressió de la β -Gal (Chen *et al.*, 1997). També es va observar la pèrdua d'expressió quan s'utilitzaven vectors HdAd- β -Gal al pulmó (Toietta *et al.*, 2003).

A més a més de la resposta immunitària contra el transgèn, també s'ha de tenir en compte que aquesta pot ser provocada pel promotor utilitzat, en aquest cas el CMV. S'ha descrit que l'interferó γ , el qual pot ser produït en el decurs de la resposta immune mediada pels limfòcits T, pot inhibir el promotor CMV (Harms *et al.*, 1995). Per altra banda, també pot ser deguda a la transducció de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC). En aquest sentit, s'ha descrit que els vectors AAV poden transduir les APC menys eficientment que els vectors adenovirals, i per tant, són capaços d'evadir la immunitat (Jooss *et al.*, 1998). D'acord amb aquest estudi, l'administració de AAV que expressaven GFP sota el control del promotor CMV per via intraductal a ratolins CD1, procediment molt semblant al desenvolupat en el treball amb els HdAd, no va induir cap resposta immunològica (Jimenez *et al.*, 2011).

Per evitar aquest silenciament causat pel promotor ubic, es va utilitzar un promotor de mamífer específic de teixit, el promotor elastasa, HdAd-Elastasa-GFP. L'administració d'aquest vector viral va permetre mantenir l'expressió de la GFP fins als 30 dies posteriors a la injecció intraductal al pàncrees, observant cèl·lules GFP positives a la regió exocrina. Tot i això, la infiltració limfocitària també era evident en aquests animals, fet que suggeria una forta resposta contra el transgèn. Possiblement, en el nostre anàlisi *in vivo*, les cèl·lules presentadores d'antigen podrien haver estat transduïdes pels HdAd, sent l'expressió de la GFP més forta quan l'expressió era regulada pel promotor CMV en comparació amb el promotor específic de cèl·lules acinars Elastasa.

L'administració del gen reporter GFP estava provocant en els animals una resposta immune contra el transgèn, per tant, la utilització d'un transgèn de mamífer no immunogènica com és el cas de la seAP hauria de reduir aquesta resposta. Així, en el nostre model animal en el qual se li va administrar la seAP humana sota el control del promotor hIns, no es va observar la pèrdua d'expressió del transgèn obtenint valors fins als 8 mesos

de tractament, fet que suggeria una resposta immunitària mínima. La manca d'immunogenicitat contra la proteïna seAP podria ser deguda a l'alta homologia entre la seAP humana i murina, més del 77% segons el BLAST. A més a més, cal destacar que el fet d'expressar la seAP només a les cèl·lules β , degut a l'especificitat del promotor, podria prevenir l'activació de les cèl·lules presentadores d'antigen i la resposta dels limfòcits T contra el transgèn.

La injecció intraductal, ens permet una injecció localitzada al pàncrees disminuint així la distribució dels vectors als teixits perifèrics, però és una tècnica invasiva ja que s'ha d'anestesià l'animal i realitzar la cirurgia a la regió abdominal. Per tant, una injecció intravenosa a través de la cua on no es requereix adormir l'animal pot ser un gran avantatge. Quan es va avaluar la via d'administració del vector viral, per via intravenosa els nivells de seAP eren pràcticament nuls en les dues soques analitzades de ratolins, C57Bl6 i ICR, possiblement perquè tots els vectors virals quedarien retinguts al fetge de l'animal sense poder-se expressar. En canvi, per via intraductal no hi havia diferències entre les dues soques, obtenint valors de seAP durant tots els mesos de seguiment realitzats.

Cal destacar que només amb un 1% de cèl·lules β transduïdes pels HdAd és suficient per obtenir nivells detectables de seAP en sèrum. Aquests resultats posen de manifest el grau de sensibilitat del transgèn reporter i permet fer un seguiment no invasiu de la massa de cèl·lula β de l'animal a llarg termini. En futurs estudis, caldria avaluar si aquest 1% de cèl·lules transduïdes seria suficient per detectar canvis en la massa de cèl·lula β en animals en processos diabètics o en models de pancreatitis.

En resum, s'ha pogut demostrar que els HdAd són capaços de transduir les cèl·lules exocrines i endocrines del pàncrees *in vivo* quan són administrats per via intraductal i expressar el transgèn a llarg termini (manuscrit en revisió a la revista *Human Gene Therapy*).

Així com en els HdAd, estudis previs al laboratori també han demostrat l'eficiència de transducció dels vectors virals AAV en el teixit pancreàtic (Jimenez *et al.*, 2011) i en el teixit adipós (Jimenez *et al.*, 2013). En l'estudi de la transducció al pàncrees es van analitzar diversos serotips dels AAV. El AAV9 amb un promotor ubico CAG, amb una dosi intermitja dels vectors (3×10^{11} gv/ratolí) i administrat via intraductal va aconseguir un 30% de transducció a les cèl·lules acinars, un 80% d'illots pancreàtics i un 15% de les cèl·lules β d'aquests illots (Jimenez *et al.*, 2011).

Tot i que existeixen estudis experimentals on demostren que els AAV, tenen una capacitat molt baixa d'activar la resposta immune innata de l'organisme respecte altres vectors virals com els Adenovirus (McCaffrey *et al.*, 2008), el transgèn GFP també podria provocar una lleugera resposta. Per evitar aquests efectes negatius, es va utilitzar un gen reporter no immunogènic, la seAP, per avaluar l'eficiència de transducció al pàncrees exocrí quan el transgèn estava sota el control del promotor Elastasa.

La utilització de la seAP com a gen marcador no immunogènic que es secreta a la circulació sanguínia ens permet fer el seguiment de la transducció del vector viral *in vivo* a un mateix animal durant un llarg període de temps. Concretament quan vam injectar per via intraductal el vector viral AAV9-Elastasa(-205/+8)-seAP vam poder fer el seguiment de l'expressió de la seAP a llarg termini, fins als 4 mesos de duració de l'estudi.

Es important destacar, a diferència dels ratolins transgènics, que amb els vectors virals podem estudiar les diferències de transducció i d'expressió del transgèn segons la via d'administració i la soca de ratolí utilitzada. Els nostres resultats demostren que hi ha diferències de transducció del vector viral segons la soca de ratolí utilitzada, observant així una mínima expressió dels nivells de seAP en els ratolins ICR independentment de la via d'administració. En canvi, en els ratolins C57Bl6 no vam veure diferències significatives respecte la via d'administració. Recentment, s'han publicat resultats semblants en el teixit adipós on es va observar una major transducció amb vectors AAV9 en els ratolins C57Bl6 respecte els ICR (Jimenez *et al.*, 2013). Per tant, és molt important triar el promotor, la via d'administració i la soca segons el teixit diana que es vulgui transduïr.

Aquestes aproximacions desenvolupades per a l'anàlisi de les cèl·lules del pàncrees poden ser útils per avaluar possibles teràpies per a la diabetis i altres malalties pancreàtiques, com la pancreatitis crònica o els tumors pancreàtics.

Una possible teràpia per al tractament de la diabetis tipus 1 és la transdiferenciació cap a un fenotip β *in vivo*. S'estan desenvolupant estratègies basades en la teràpia gènica per a la diabetis on s'utilitzen factors de transcripció pro-endocrins per a la reprogramació de cèl·lules no β a cèl·lules β o amb un fenotip semblant a les cèl·lules de l'illot que reverteixin la hiperglucèmia en models de rosegadors.

Durant el desenvolupament embrionari del pàncrees, tant les cèl·lules exocrines com les endocrines provenen d'una mateixa població cel·lular (Mansouri *et al.*, 2012). És possible que les cèl·lules endocrines i exocrines puguin compartir algunes propietats en

l'estat de la cromatina, com a resultat de la seva relació en el desenvolupament, i així, puguin facilitar la reprogramació a través de la sobre-expressió dels factors de transcripció seleccionats. Per exemple, a les cèl·lules exocrines els gens específics de les cèl·lules endocrines no s'expressen, però a nivell de cromatina inactiva, eucromatina, aquesta pot ser accessible pels diferents factors de transcripció i facilitar el procés. Les modificacions epigenètiques tenen un paper fonamental en la regulació de la transcripció i són importants per a l'especificitat i la proliferació de les cèl·lules (Bernstein *et al.*, 2007). Estudis epigenètics han demostrat que canvis en l'acetilació de les histones poden alterar la diferenciació i composició del pàncrees durant l'embriogènesi (Haumaitre *et al.*, 2008; Lenoir *et al.*, 2011). Estudis de metilació de les histones en el promotor *Pdx1* suggereixen una configuració oberta de la cromatina en les cèl·lules pancreàtiques i, en canvi, completament inactiva a les cèl·lules no pancreàtiques (Akinci *et al.*, 2012; Bramswig *et al.*, 2013). Estudis anteriors relacionats amb la metilació d'histones i del DNA indiquen que la sobre-expressió i la combinació dels tres factors PNM modifiquen la cromatina per tal de promoure l'expressió (Akinci *et al.*, 2012). L'ús d'inhibidors d'histones metiltransferases han estat provats amb l'objectiu de reprogramar cèl·lules α pancreàtiques humanes cap a un fenotip β , i han mostrat una plasticitat epigenètica (Bramswig *et al.*, 2013).

Està descrit que per mitjà dels tres factors de transcripció *Pdx1*, *Neurog3* i *MafA* es pot reprogramar cèl·lules no β en cèl·lules productores d'insulina a través d'un Adenovirus (Akinci *et al.*, 2012; Banga *et al.*, 2012; Kojima *et al.*, 2003; Yechoor *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2008). Els estudis previs l'administració dels factors de transcripció era per mitjà de vectors adenovirals i per via intravenosa, intrahepàtica o directa al pàncrees en els animals immunodeprimits (Akinci *et al.*, 2012; Banga *et al.*, 2012; Kojima *et al.*, 2003; Yechoor *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2008).

Fins a l'actualitat no hi ha resultats que posin de manifest la reprogramació de les cèl·lules exocrines del pàncrees en cèl·lules β per mitjà dels tres factors de transcripció *Pdx1*, *Neurog3* i *MafA* a través de l'ús dels vectors virals AAV i en animals immunocompetents. Aquesta estratègia seria més adequada per una possible translació de teràpia gènica cap al tractament d'humans, respecte a la que utilitzen adenovirus.

Donat els resultats obtinguts en la transducció del pàncrees exocrí mitjançant el vector AAV9-Elastasa(-205/+8)-seAP, es va escollir la injecció intraductal al pàncrees i la soca de ratolins C57Bl6 per avaluar la transdiferenciació del pàncrees exocrí en cèl·lules productores d'insulina per mitjà dels tres factors de transcripció. Per tant, en aquest treball es van utilitzar els vectors AAV de serotip 9, els quals s'ha demostrat que presenten

una major capacitat de transducció de les cèl·lules exocrines respecte altres serotips (AAV6 i AAV8) del 30%, quan són injectats per via intraductal a una dosi de 3×10^{11} gv per animal. A més a més, per obtenir una expressió específica a les cèl·lules exocrines es va utilitzar el promotor Elastasa (Jimenez *et al.*, 2011).

Així, després d'un mes de la injecció dels tres factors independents a ratolins sans vam observar la sobre-expressió específica dels tres factors localitzada al pàncrees exocrí. Cal tenir en compte que quan analitzem els factors de transcripció *Pdx1* i *MafA* per qPCR també detectem l'expressió endògena del propi pàncrees, en canvi això no passa amb la *Neurog3* ja que la seva expressió després del naixement és pràcticament nul·la (Rukstalis *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2013). Per aquest motiu els valors de l'expressió relativa respecte els animals control de la *Neurog3* sempre han estat superiors.

Per altra banda, quan vam analitzar els gens implicats en la producció i secreció de la insulina vam observar un increment significatiu de *Ins1*, *Ins2*, *Gcg*, *Slc2a2* i *Iapp*. Com s'ha anomenat anteriorment, el promotor Elastasa (-205/+8) utilitzat és específic de les cèl·lules exocrines però presenta una mínima expressió també en les cèl·lules β del pàncrees (Kruse *et al.*, 1988; Kruse *et al.*, 1993; *et al.*, 1995). Per tant, no es pot descartar que aquest augment dels gens endocrins puguin ser degut parcialment a la transducció dels tres factors a les cèl·lules β , entre els quals *Pdx1* i *MafA* està descrit que s'uneixen directament al promotor de la insulina.

Quan es van tractar els animals diabètics amb els vectors virals no vam poder revertir els nivells de glucèmia tot i que els nivells d'expressió dels tres factors estaven significativament incrementats. Es va observar també un augment del gen de la insulina i en gens involucrats en la producció i secreció de la insulina, en aquest cas no estadísticament significatiu. L'increment en l'expressió de la insulina l'atribuïm a la sobre-expressió dels tres factors PNM a les cèl·lules exocrines i no a la mínima transducció de les cèl·lules β per acció del promotor Elastasa. L'increment en els nivells de RNA de la insulina tampoc es pot atribuir a l'efecte de l'STZ ja que sinó, en els animals control tindrien els mateixos nivells d'insulina al primer mes. Tot i que la producció d'insulina en múltiples òrgans ha estat prèviament descrita en resposta al tractament amb STZ (Kojima *et al.*, 2004).

Davant dels resultats obtinguts, per poder revertir la hiperglucèmia diabètica podria ser que necessitéssim augmentar la dosi viral. Hi ha autors que demostren que la combinació amb un Ad de primera generació codificant una proteïna no relacionada ni amb el vector viral ni amb els factors de transcripció és necessari per a la correcció de la

hiperglucèmia utilitzant els mateixos factors al fetge (Wang *et al.*, 2007). Per aquest motiu vam coinjectar els tres factors amb un Ad5 que no codifica per cap proteïna (Ad-nul). Després de 5 mesos de tractament en ratolins C57Bl6 diabètics, vam observar que les glucèmies dels animals amb els tres factors eren lleugerament inferiors als animals amb vector nul. Aquesta reducció en la glucèmia es podia explicar per l'increment significatiu de l'expressió de *Ins1*. A més a més, tot i no ser significativament superiors, la resta de gens estudiats (*Ins2*, *Gcg*, *Gck*, *Slc2a2*, *Iapp* i *NeuroD1*) també estaven incrementats en els ratolins AAV9-PNM respecte els animals nul.

Els nostres resultats demostraven que la co-administració dels AAV amb els tres factors amb un Ad5 nul afavoria una lleugera disminució de la hiperglucèmia respecte els animals control, tant si els factors eren administrats independentment o en tàndem al mateix vector viral. Existeixen diferents explicacions sobre l'efecte dels Ad5:

Wang i col·laboradors mostren que hi ha la producció d'insulina en ratolins diabètics i la recuperació dels nivells de glucèmia després de la transducció del fetge amb un FGAd i un HdAd que expressen el *Pdx1* o la *Neurog3*. En canvi, utilitzant els AAV no observen els mateixos resultats. Els autors associen aquests resultats a l'efecte de la càpside dels adenovirus i no exclusivament als factors de transcripció (Wang *et al.*, 2007). Els Adenovirus provoquen una elevada resposta immune desencadenant l'expressió d'una gran cascada de molècules implicades al procés, de les quals alguna d'elles podrien estar implicades directament o indirectament amb una possible transdiferenciació. Ratolins RAG-1 immunodeficients tractats amb STZ no van recuperar els nivells normoglucèmics al utilitzar la combinació de *Pdx1* o *Neurog3* i un Adenovirus, suggerint que una resposta immune depenent de l'antigen era necessària per a la correcció de la glucèmia (Wang *et al.*, 2007). Estudis de *microarrays* realitzats a ratolins tractats amb vectors AAV i Ad mostren una gran diferència en els perfils d'expressió de gens, molts dels quals implicats en la resposta immune, en comparació amb l'ús de AAV sols (Wang *et al.*, 2007).

Altres autors creuen que l'efecte dels adenovirus es deu a modificacions a nivell de cromatina. La co-administració dels Ad (o un plasmidi que expressa el gen adenoviral E4-ORF3) i Lentivirus amb el factor de transcripció *Pdx1* és necessària per a la producció de glucagó a les cèl·lules mesenquimals humanes (hMSC) (Zaldumbide *et al.*, 2012). En aquests cas els Ad indueixen la formació d'heterocromatina i interfereixen directa o indirectament amb el complex Histona deacetilases (HDACs)/*Pdx1* (Zaldumbide *et al.*, 2012), de manera que els gens que estan normalment en regions d'eucromatina a la

cèl·lula diferenciada gràcies a l'ús d'un Ad podrien ser accessibles pels tres factors de transcripció administrats pels vectors virals AAV.

La reprogramació d'un model cel·lular per sobre-expressió de factors de transcripció per generar iPSC ha estat estudiat més intensament (Haumaitre *et al.*, 2008). En aquests estudis, només una petita fracció de les cèl·lules que sobre-expressen els factors de transcripció (Oct4, Sox2, Klf4, i c-Myc) donen lloc a les iPSC. Per augmentar l'eficiència s'han dissenyat petites molècules (Shi *et al.*, 2008), agents macromoleculars (Singhal *et al.*, 2010) o l'ús de factors de transcripció modificats (Hirai *et al.*, 2011) que faciliten l'obertura i tancament de la cromatina, i així els factors de transcripció sobre-expressats tenen major facilitat per trobar els gens diana i regular els gens que condueixen a un nou estat estable de l'expressió gènica. Un exemple és l'article publicat recentment per Banga i col·laboradors on animals diabètics immunocompetents tractats amb un Ad-CAG-PNM per via intravenosa i un agonista PPAR (WY14643), el qual augmenta la divisió cel·lular al fetge, presenten uns nivells de glucèmia normalitzats. Els autors conclouen que l'efecte observat per l'agonista és degut a que augmenta la susceptibilitat dels factors de transcripció a arribar als gens diana durant la proliferació. Durant aquest procés es replica el DNA el qual comporta una separació temporal de la cromatina, de manera que, els gens que en condicions normals estan inaccessibles esdevenen de forma transitòria accessibles pels tres factors de transcripció introduïts i, així poden actuar promovent la reprogramació cap a un fenotip β (Banga *et al.*, 2013).

Per tant, una possible alternativa a la nostra estratègia podria ser la co-administració dels AAV9-PNM amb un agent que intervingui en la modificació de la cromatina i així, facilitar el procés de reprogramació de cèl·lules no β a una cèl·lula productora d'insulina que permeti normalitzar els nivells de glucèmia d'un animal diabètic. Per exemple, es podria utilitzar diferents inhibidors de les histones deacetilases (HDACi) com l'àcid valproic (VPA), la TSA (Trichostatin A) o el Butirat Sòdic (NaB) (Haumaitre *et al.*, 2008).

Per altra banda, a més dels factors de transcripció, s'ha demostrat que el desenvolupament embrionari dels illots pancreàtics i la diferenciació cap a cèl·lules β estan controlats per un conjunt de microRNAs (miRNAs) (Joglekar *et al.*, 2009). Per tant, el procés de transdiferenciació de cèl·lules acinars cap a cèl·lula β podria també estar controlat també per una sèrie de miRNAs. Per tant, seria de gran interès identificar quins miRNAs estan alterats en el procés. Co-injectar AAV amb els miRNAs clau identificats en

combinació amb els PNM seria una aproximació de teràpia gènica interessant per revertir la hiperglucèmia dels animals diabètics.

En resum, en aquesta tesi s'han desenvolupat tres aproximacions per a l'anàlisi de les cèl·lules del pàncrees. S'ha generat un ratolí transgènic RIP-1/ β -Gal que expressa el transgèn de la β -Gal en un 90% de les cèl·lules β sense afectar a l'estructura i funcionalitat tant de l'illot com de les cèl·lules β . Aquests ratolins poden ser molt útils per avaluar la massa de cèl·lula β al llarg de la vida de l'individu així com en processos patològics i en possibles teràpies relacionades. Per altra banda, a través de la transferència gènica de vectors virals mitjançant HdAd i AAV s'ha avaluat la seva transducció al pàncrees, sent una eina favorable i segura pels ratolins en la manipulació genètica dels diferents models cel·lular del pàncrees. Amb la finalitat de reprogramar les cèl·lules exocrines del pàncrees en cèl·lules productores d'insulina s'han utilitzat els vectors virals AAV per a la seva manipulació. Així, s'han administrat els vectors AAV9 que expressaven tres factors de transcripció endocrins importants, *Pdx1*, *Neruog3* i *MafA* específicament a les cèl·lules exocrines. Hem observat una transdiferenciació parcial de les cèl·lules exocrines cap a un fenotip β als animals tractats amb els vectors PNM. A més a més, a través de la co-administració d'un Ad amb els AAV a animals immunocompetents hem aconseguit disminuir lleugerament els nivells d'hiperglucèmia d'un animal diabètic observant-se un increment significatiu de l'expressió del gen de la insulina.

VI. CONCLUSIONS

1. S'ha generat un animal transgènic que expressa la β -Gal sota el control del promotor d'insulina de rata (RIP-I). Dels animals transgènics fundadors obtinguts, s'han amplificat 3 línies: la L3 amb elevat nombre de còpies del transgèn, i la L4 i la L5 amb un nombre similar de còpies. L'expressió del transgèn no alterava en cap cas la funcionalitat de les cèl·lules β .
2. La L5 és la que presentava un nombre de cèl·lules doble positives $\text{Ins}^+/\beta\text{-Gal}^+$ més elevat ($\approx 90\%$). Per tant, els animals transgènics de la L5 podrien ser molt útils per a l'anàlisi dels canvis en la massa i regeneració de la cèl·lula β .
3. S'han generat i amplificat els vectors virals HdAd-hIns-seAP, específic per les cèl·lules β . La transducció del pàncrees mitjançant aquest vector ha permès expressar la proteïna a llarg termini i sense signes d'immunogenicitat contra la seAP, fet que indica que els HdAd poden ser utilitzats per expressar una proteïna d'interès al pàncrees a llarg termini.
4. S'ha generat i amplificat el vector viral AAV9-Elastasa(-205/+8)-seAP, específic per les cèl·lules acinars del pàncrees. La transducció del pàncrees mitjançant aquest vector ha permès avaluar i comparar les diferències en la transducció del pàncrees segons la via d'administració i la soca de ratolí utilitzada. Els animals C57Bl6 mostraven una major transducció respecte els ICR, independentment de la via d'administració utilitzada.
5. S'han generat i produït els vectors virals AAV9-Elastasa(-205/+8)-Pdx1, AAV9-Elastasa(-205/+8)-Neurog3 i AAV9-Elastasa(-205/+8)-MafA. La transducció del pàncrees mitjançant els vectors AAV ha permès l'expressió ectòpica dels tres factors Pdx1, Neurog3 i MafA a les cèl·lules exocrines del pàncrees d'animals immunocompetents sans i diabètics.
6. En ratolins C57Bl6 sans, la transducció del pàncrees amb AAV9-PNM ha permès un increment estadísticament significatiu de l'expressió dels gens de la *Ins1* i *Ins2*, així com també d'altres gens involucrats en la síntesi i secreció de la insulina: *Gcg*, *Slc2a2* i *Iapp*.
7. La teràpia combinada d'un Adenovirus i l'AAV9-PNM ha permès un increment significatiu de l'expressió dels gens *Ins1* i *Ins2* juntament amb una lleugera disminució de les glucèmies en ratolins diabètics respecte els animals nul, suggerint una reprogramació parcial de les cèl·lules acinars del pàncrees cap a cèl·lules productores d'insulina.

-
- 8.** Per tant, les aproximacions desenvolupades en aquesta tesi han demostrat que la manipulació genètica del pàncrees, tant de les cèl·lules endocrines com de les exocrines, pot permetre fer un seguiment de les cèl·lules pancreàtiques i avaluar possibles teràpies per a la diabetis o per altres malalties pancreàtiques.

VII. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Animals

Tots els animals mascles utilitzats de les soques C57Bl6 i ICR de 8 setmanes d'edat (Harlan Teklad, Barcelona, Espanya) van estar estabulats en instal·lacions lliures de patògens (SER-CBATEG) i alimentats *ad libitum*, és a dir, sense restringir-los l'accés al menjar, amb una dieta estàndard (Teklad Global; Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EEUU) i es mantingueren en condicions de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) i llum controlades (cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor).

Els ratolins transgènics RIPI/ β -Gal obtinguts en aquest treball es van generar a partir de ratolins híbrids C57Bl6/SJL (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EEUU).

Per la presa de mostres, els animals s'anestesiaren mitjançant anestèsics inhaladors (Isoflurano, IsoFlo®, Abbott Animal Health, Illinois, EEUU) i van ser eutanasiats per decapitació. Les mostres de sang i teixits van ser preses entre les 9:00 i les 11:00 del matí, immediatament eren congelades amb N_2 líquid i guardades a -80°C (sangs i teixits) o en formol (teixits).

Tots els procediments experimentals foren aprovats pel Comitè d'Ètica i d'Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

1.2. Soques bacterianes

Es van utilitzar les soques *E.coli XL2Bue* (Stratagene-Agilent tecnologies, Santa Clara, CA, EEUU) i/o cèl·lules *E.coli* BJ5183 (Stratagene-Agilent tecnologies, Santa Clara, CA, EEUU) per obtenir els diferents constructes plasmídics utilitzats en aquest treball. Tots els plasmidis contenen el gen de la resistència a l'Ampicil·lina per ser seleccionades. El cultiu bacterià es va fer créixer en medis de LB sòlid (Miller's LB Broth, Conda, Madrid, Espanya) amb 2% d'agar i amb $50\mu\text{g/ml}$ d'ampicil·lina.

1.3. Sondes de DNA

La sonda utilitzada per detectar la incorporació del transgèn mitjançant *Southern Blot* es va utilitzar tot el constructe microinjeat (RIPI/ β -Gal), digerit amb l'enzim de restricció BamHI i marcat amb ^{32}P . Després de la hibridació de la sonda al *Southern Blot*,

en els animals transgènics s'havia d'observar dues bandes una de 564pb (promotor RIP-I) i una de 8554 pb corresponent a la resta del plasmidi utilitzat com a sonda.

1.4. Anticossos

Les mostres de teixits van ser fixades amb una solució tamponada de formol al 10%, eren incloses en blocs de parafina per posteriorment obtenir seccions de 2-3µm i ser incubades amb els anticossos corresponents. Els anticossos primaris utilitzats per a la detecció de proteïnes per immunohistoquímica van ser els següents: cabra anti-GFP (ab6673; Abcam, Cambridge, MA, EEUU), conill anti-Insulina (I-8510; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), conill anti-PDX1 (07-696; Millipore, Billerica, MA, EEUU), conill anti-MafA (sc-66958; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU), conill anti-β-Gal (ab-616; Abcam, Cambridge, MA, EEUU), conill anti-Glucagó (Signet 219-01, Cambridge Research Laboratories, Inc, Cambridge, MA, EEUU).

Com a anticossos secundaris es va utilitzar l'anticòs d'ase contra cabra biotinitat (sc-2042; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU), anticòs de cabra contra conill biotinitat (31820; Pierce, Rockford, IL, EEUU) i anticòs de cabra contra conill conjugat amb TRITC (A-11011; Molecular Probes, Barcelona, Spain). Streptavidina conjugada amb Alexa Fluor 488 (FITC) (Life Technologies) i la 3,3-Diaminobenzidina (DAB) van ser utilitzades per imatges en fluorescència i camp clar, respectivament. Les seccions van ser comarcades amb DAPI (Sigma-Aldrich) per al marcatge fluorescent dels nuclis. En el cas de les imatges DAB en camp clar s'utilitza contrastació amb hematoxilina únicament. En alguns casos, la tinció amb Hematoxilina-Eosina (H/E) (Sigma-Aldrich) va ser utilitzada per les imatges en camp clar.

1.5. Reactius

Els reactius de biologia molecular s'obtingueren de les cases comercials Roche (Roche Diagnostics Corp., IN, EEUU), Invitrogen Corporation (actualment Life Technologies) (San Diego, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St.Louis, MO, EEUU), Promega Corporation (Madison, WI, EEUU), BASF (Barcelona, Espanya), Qiagen (Hilden, Alemanya), QBIogen (actualment MP Biomedicals) (Irvine, CA, EEUU) i Fermentas (St. Leon-Rot,

Alemanya). Els medis de cultiu i els antibiòtics s'obtingueren de PAA (Pasching, Austria) i el sèrum (FBS) de Gibco (Invitrogen, Life Technologies).

1.6. Plasmidis

Els plasmidis utilitzats en aquest estudi es resumeixen en aquesta taula:

Nom	Promotor	Gen d'interès	WPRE	PolyA
P123T RIPI β -Gal	RIP-I	β -Gal	si	SV40
pGG2 Elastasa (-205/+8) seAP	Elastasa (-205/+8)	seAP	no	SV40
pGG2 Elastasa (-205/+8) Pdx1	Elastasa (-205/+8)	Pdx1	no	SV40
pGG2 Elastasa (-205/+8) Neurog3	Elastasa (-205/+8)	Neurog3	no	SV40
pGG2 Elastasa (-205/+8) MafA	Elastasa (-205/+8)	MafA	no	SV40
pGG2 Elastasa (-205/+8) null	Elastasa (-205/+8)	no	no	SV40
pAAV MCS	CMV	no	no	hGH
pFK7	CMV	GFP		
pEA4	CMV	RFP		
pEA9	Elastasa (-205/+8)	GFP		
pEA11	hIns	seAP		

Els promotor hIns (*human Insulin*) s'expressa exclusivament a les cèl·lules β del pàncrees. Per altra banda el promotor Elastasa (-205/+8), promotor elastasaI de rata, promouen una elevada expressió a les cèl·lules acinars i mínima a les cèl·lules β del pàncrees (Kruse *et al.*, 1993; *et al.*, 1995). El promotor ubico CMV conté el promotor principal de citomegalovirus humà.

L'element WPRE (*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*) és una seqüència de l'Hepadnavirus altament utilitzada com a regulador de l'expressió a nivell *cis* de diferents tipus de plasmidis o de gens en vectors virals. Quan es troba en l'extrem 3'UTR del casset d'expressió, el WPRE augmenta l'expressió del transgèn incrementant els nivells de mRNA tant al citoplasma com al nucli (Zanta-Boussif *et al.*, 2009).

Les diferents estratègies de clonatge utilitzades per a la generació dels diferents plasmidis es resumeixen en la taula següent:

Nom	Estratègia de clonatge	
P^{123T} RIP-I β-Gal	vector	P ^{123T} RIP-I IGFI (CBATEG) digerit amb EcoRI (+roms)
	insert	pKS RIP-I β-Gal (CBATEG) digerit amb SacII i SmaI (+roms)
pGG2 Elastasa (-205/+8) seAP	vector	pGG2 Elastasa (-205/+8) GFP (CBATEG) digerit amb MfeI i NheI
	insert	pTG6600 seAP (CBATEG) digerit amb MfeI i NheI
pGG2 Elastasa (-205/+8) PDX1	vector	pGG2 Elastasa (-205/+8) GFP (CBATEG) digerit amb EagI
	insert	pCR Blunt TOPO PDX1 (OpenBiosystems) digerit amb EagI
pGG2 Elastasa (-205/+8) Ngn3	vector	pGG2 Elastasa (-205/+8) GFP (CBATEG) digerit amb MluI i HindIII (+roms)
	insert	pCR-BluntII-TOPO-Ngn3 (OpenBiosystems) digerit amb EcoRV i HindIII
pGG2 Elastasa (-205/+8) MafA	vector	pGG2 Elastasa (-205/+8) GFP (CBATEG) digerit amb EagI
	insert	pCMV6-Kan/Neo MafA (OriGene Technologies) digerit amb EagI
pGG2 Elastasa (-205/+8) null	vector	pGG2 Elastasa (-205/+8) GFP (CBATEG) digerit amb EagI
	insert	-
pAAV MCS	Stratagene	
pFK7	S. Kochanek (Ulm University)	
pEA4	CBATEG	
pEA9	CBATEG	
pEA11	vector	pSTK119 (S. Kochanek (Ulm University) digerit amb EcoRV
	insert	pEA10 (CBATEG) digerit amb PvuI

2. MÈTODES

2.1. Tècniques bàsiques de DNA

2.1.1. Preparació del DNA plasmídic

Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic (3-4 µg) es van realitzar *minipreparacions (minipreps)* segons el protocol de lisi alcalina originalment descrit per Birnboim i col·laboradors (Birnboim *et al.*, 1979). A partir de 1-2ml de medi de cultiu (LB amb l'antibiòtic corresponent) es degrada la paret bacteriana per acció de l'enzim lizozim, seguida d'una lisi alcalina i de la precipitació selectiva del DNA genòmic i proteïnes desnaturalitzants amb una solució d'acetat de potassi a pH àcid. El RNA bacterià es degradat amb l'addició de RnasaA.

D'altra banda, l'obtenció de grans quantitats de DNA es va realitzar mitjançant *maxipreparacions (maxipreps)*, s'obtenia com a màxim 1mg de plasmidi de DNA, o *megapreparacions (megapreps)* amb un màxim de 2.5mg de plasmidi de DNA, a partir de 250-500 ml de medi de cultiu respectivament. El mètode està basat igualment en la lisi alcalina, però la purificació de DNA, en aquest cas, es realitza mitjançant columnes d'adsorció de Quiagen^{MR}. *PureYieldTM Plasmid MaxiPrep System* (Promega Corporation) o *EndoFree Plasmid Mega Kit* (Qiagen) van ser utilitzats.

2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció

Cada enzim de restricció requereix unes condicions de reacció específiques de pH, força iònica i temperatura. S'han seguit les instruccions de la casa comercial (New England Biolabs, Roche, Promega o Fermentas). En general el DNA va ser digerit amb 0.5 unitats d'enzim per µg de DNA en el *buffer* subministrat pel fabricant durant 1-2 hores a la temperatura òptima de cada enzim. El producte de la reacció va ser analitzar en gels d'agarosa. Quan el DNA havia de ser digerit amb 2 o més enzims de restricció, les digestions es van dur a terme conjuntament sempre que les condicions de *buffer* i temperatura fossin compatibles. Si els enzims tenien diferents requeriments, després de la primera digestió el DNA era purificat de les sals i de l'enzim a través del *GeneClean[®] kit* (QBIogene) segons les instruccions del fabricant. El DNA és eluït en 30 µl amb el *buffer* d'elució administrat pel fabricant per realitzar la segona digestió.

2.1.3. Desfosforilació de fragments de DNA

El DNA un cop digerit, pot ser que el vector plasmídic es pugui tornar a lligar. Aquest procés es pot evitar mitjançant l'eliminació dels residus fosfats a l'extrem 5' del vector. Es va utilitzar 1 unitat de fosfatasa alcalina per μg de DNA (Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega) en el tampó comercial 1X. La reacció de desfosforilació es va realitzar durant 30 minuts a 37°C. Posteriorment es va inactivar l'enzim a 65°C durant 15 minuts per evitar qualsevol interacció de la fosfatasa a la reacció de la lligació.

2.1.4. Generació d'extrems roms de fragments de DNA

En els casos on l'enzim de restricció deixava els extrems cohesius i es necessitaven extrems roms pel clonatge, el fragment digerit va ser tractat amb l'enzim *Klenow DNA polimerasa* (New England Biolabs). En presència de la doble cadena de DNA i deoxinucleòsids trifosfats (dNTPs), la DNA polimerasa reomple l'extrem generat per l'enzim de restricció protuberant (activitat polimerasa 5'→3' o 3'→5'). En absència de dNTPs l'enzim elimina l'extrem 3' protuberant mitjançant la seva acció exonucleasa (3'→5'), en canvi, no té activitat exonucleasa 5'→3'. La reacció es va fer seguint les instruccions de la casa comercial.

2.1.5. Construcció de molècules híbrides: lligació i recombinació homòloga

Per a la construcció de molècules híbrides de DNA a partir de diferents fragments es pot fer per acció de la lligasa (lligació) o en altres casos per recombinació homòloga. Pel primer mètode, es van barrejar els fragments de DNA a diferents ratis del vector i de l'insert (1:1, 1:5, 1:10) amb l'enzim DNA Lligasa del bacteriòfag T4 (New England Biolabs) i del tampó corresponent segons el protocol establert per la casa comercial. Els productes resultants de la lligació van ser transformats en cèl·lules competents *E.coli* de la soca XL2-blue (Stratagene-Agilent technologies, Santa Clara, CA, EEUU) mitjançant l'electroporació.

Després de la transformació en les cèl·lules bacterianes es sembraven les cèl·lules en plaques de LB i amb els antibiòtics segons la resistència dels plasmidis utilitzats. Es van deixar les plaques a l'estufa durant 12 hores a 37°C. Posteriorment es va extreure el DNA de les colònies recombinants i es va analitzar per enzims de restricció la presència de les molècules híbrides de DNA.

A la recombinació homòloga en aquest cas, no es va afegir l'enzim lligasa i els fragments de DNA linealitzats es van transformar per electroporació en les cèl·lules *E.coli*

BJ5183 (Stratagene-Agilent technologies, Santa Clara, CA, EEUU), les quals tenen una elevada taxa de recombinació, a diferents ratis del vector i de l'insert (1:1, 1:5, 1:10). Al dia següent després de les colònies obtingudes en les plaques es va extreure el DNA plasmídic i es van analitzar les colònies amb el plasmidi híbrid. Per evitar altres recombinacions, amb els plasmidis híbrids obtinguts, sense l'enzim lligasa, es van transformar els bacteris *E.coli XL2-blue* (Stratagene-Agilent technologies) per electroporació.

2.1.6. Transformació en cèl·lules competents: *E.coli XL2-blue* i *E.coli BJ5183*

El plasmidi de DNA pot ser introduït a cèl·lules bacterianes competents a través de la transformació. L'electroporació va ser el mètode escollit. 40µl de cèl·lules competents (2×10^{10} cèl·lules/ml) van ser descongelades en gel fins a ser utilitzades. 1µl (aproximadament 10 ng) de la reacció de lligació del DNA o DNA control va ser afegit directament a les cèl·lules competents. Després de la incubació amb gel durant 5 minuts, les cèl·lules van ser electroporades a 2500V amb l'electroporador (Bio-Rad). Posteriorment, es van afegir 200 µl de LB, es van sembrar en plaques amb LB amb l'antibiòtic corresponent i van ser incubades a 37°C o/n.

2.1.7. Obtenció del DNA i purificació

Els gels d'electroforesi d'agarosa són el mètode estàndard utilitzats per separar, identificar i purificar els fragments de DNA. Per separar fragments de DNA entre 0.2-7 kb es van utilitzar gels d'agarosa al 1%. La localització i la mida del DNA en el gel es va determinar mitjançant l'addició al gel de baixes concentracions (0.5µg/ml) de Bromur d'Etidi fluorescent el qual s'intercala entre les dues cadenes de DNA. La presència de DNA es visualitzava utilitzant llum ultraviolada (UV) de baixa longitud d'ona (310nm) a través d'un transiluminador i un sistema de càmeres (Syngene). Com a marcador de tamany molecular de DNA es va utilitzar el *DNA ladder 1kb* (Invitrogen).

Els gels d'agarosa es van preparar dissolvent l'agarosa en *buffer* d'electroforesi 1xTAE (Trisacetate pH 8.3, 40mM i EDTA 1mM) amb 0.5 µg/ml de Bromur d'Etidi. Les mostres es van carregar al gel amb 10X tampó de càrrega (Fermentas) i amb el tampó d'electroforesi 1xTAE a 80V. Per obtenir i purificar el fragment de DNA d'interès del gel d'agarosa es va utilitzar *GeneJET™ Gel Extraction kit* (Fermentas). El DNA va ser quantificat a l'espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

2.2. Cèl·lules eucariotes en cultiu.

2.2.1. Cèl·lules *Ins-1*

La línia cel·lular INS-1 (ATCC) son derivades d'un insulinoma de rata. Per al cultiu van ser incubades a 37°C i al 8.5% de CO₂ i en medi de cultiu RPMI-1640 (PAA) amb 2µM de Glutamina, suplementat amb FBS al 10% inactivat per calor, 10 mM HEPES, 1mM de Piruvat sòdic i 50µM de 2-Mercaptoetanol. Per al manteniment de les cèl·lules, les cèl·lules INS-1 eren tripsinitzades per desadherir-se de la placa i després eren plaquejades en diferents dilucions.

2.2.2. Cèl·lules *MIN-6*

La línia cel·lular MIN-6 (ATCC) s'originen a partir d'un insulinoma del ratolí transgènic C57Bl6 (Miyazaki *et al.*, 1990). Es van mantenir amb medi DMEM suplementat amb el 15% sèrum de vedella fetal (*FCS, Foetal calf sèrum*), 25mM de glucosa, 71 µM de 2-Mercaptoetanol, 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicil·lina i 100 mg/l d'estreptomicina; incubades a 37°C i al 8.5% de CO₂.

2.2.3. Cèl·lules *266-6*

La línia cel·lular exocrina derivada del ratolí (ATCC). Eren mantingudes en medi de cultiu DMEM suplementat amb 4.5 g/l de glucosa i FBS al 10% a 37°C i al 8.5% de CO₂. Els flascons i les plaques on es feien créixer les cèl·lules eren tractades 15 minuts abans de fer-les servir amb gelatina de la pell del porc al 0.1% per evitar l'aglutinació entre les cèl·lules.

2.2.4. Cèl·lules *HEK-293*

Les cèl·lules 293 (HEK-293, ATCC), cèl·lules embrionàries de ronyó humà presenten el gen adenoviral E1 de l'Ad5 integrat de forma estable en el genoma cel·lular i van ser utilitzades per a l'amplificació dels vectors virals.

Es mantienien en medi de cultiu DMEM (PAA) amb 2mM de Glutamina, suplementat amb FBS al 10% inactivat per calor en un incubador ajustat al 8.5% de CO₂ i a 37°C. Quan tenien una confluència del 70%, les cèl·lules eren tripsinitzades i eren plaquejades en diferents dilucions.

2.2.5. Cèl·lules Cre116

Les cèl·lules Cre 116 (293 Cre,(Palmer *et al.*, 2003)) són derivades de les cèl·lules HEK-293, les quals presenten el gen adenoviral E1 de l'Ad5 i la recombinasa Cre integrades al genoma cel·lular. Van ser utilitzades per la producció i amplificació dels HdAd.

Aquestes cèl·lules creixien en el medi de cultiu MEM Earle's Salts (PAA) amb 2mM de Glutamina, suplementat amb FBS al 10% inactivat per calor, 0.1 mg/ml Hygromicina B (PAA) i opcionalment amb 100 U/ml de Penicil·lina (PAA) i 0.1 mg/dl Streptomina (PAA) per evitar la contaminació bacteriana. Es mantenien en un incubador al 5% de CO₂ i a 37°C. Les cèl·lules eren passades a noves plaques quan arribaven al 70% de confluència, en aquestes cèl·lules no és necessari utilitzar la Tripsina, amb uns lleugers copets a les plaques o amb les pipetes és suficient, tot i així, es va utilitzar la Tripsina per tal de que estessin més homogeneïtzades i els passatges fossin millor.

2.2.6. Transfecció de DNA en cèl·lules en cultiu

Per dur a terme l'anàlisi d'expressió *in vitro* dels constructes obtinguts es van realitzar transfeccions en les diferents tipus de cèl·lules tumorals amb els plasmidis corresponents descrites anteriorment.

Per a aquesta finalitat es va utilitzar la tècnica de transfecció amb Lipofectamina (Lipofectamine™2000, Invitrogen), la qual es basa en la formació d'un complex Lipofectamina-DNA per tal d'afavorir l'entrada del DNA a la cèl·lula. La proporció de Lipofectamina/DNA utilitzada va ser de 2.5µl de Lipofectamina 1mg/ml per µg de DNA. En el moment de la transfecció les cèl·lules INS-1 i HEK-293 estaven a 90-95% de confluència. Al cap de 4-6h de la transfecció es va canviar el medi i es va afegir medi complert (RPMI-1460 (10mM Glucosa), 2mM de Glutamina, 10mM HEPES, 1mM NaPiruvat, 50µM 2-mercaptoetanol i 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) prèviament inactivat 20 minuts a 65°C. L'expressió del transgèn es va analitzar a les 24-48h.

2.3. Generació del ratolí transgènic RIPI/ β -Gal

La tècnica utilitzada va ser la microinjecció de DNA en el pronucli masculí d'òcits fecundats de ratolí, portada a terme per la Unitat d'Animals Transgènics (UAT) del CBATEG.

2.3.1. Superovulació de femelles B6SJL

La superovulació té com a objectiu incrementar el nombre d'embrions obtinguts a partir d'una femella de ratolí. Es van superovular femelles C57Bl6/SJL de 4 setmanes d'edat. Dos dies abans de l'aparellament amb mascles sementals de la mateixa soca, es va tractar cada femella amb 5UI de PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*). El mateix dia de l'aparellament es va injectar intraperitonealment 5UI de HCG (*Human Chorionic Gonadotropin*) que desencadena l'ovulació. Durant la fase fosca, a la nit, es van deixar les femelles amb els mascles sementals per tal que es donés la fecundació. Al dia següent les femelles superovulades que tenien tap vaginal a les 16-18 hores de la injecció de la hormona HCG, es van extreure els embrions en estat d'una cèl·lula amb dos pronuclis.

2.3.2. Obtenció d'embrions de ratolí d'una cèl·lula

Es van sacrificar les femelles per desnucació cervical i a continuació es van extreure els oviductes, que van ser digerits amb medi KSOM/M16 (Sigma M7292) i hialuronidasa. Es van seleccionar els embrions i es van deixar amb el medi KSOM/M16 i la hialuronidasa a l'incubador a 37°C i en un ambient de gas (5%O₂, 5%CO₂ i 90%N₂) durant 30 – 60 minuts abans de la microinjecció de DNA en pronucli.

2.3.3. Microinjecció en pronucli

El DNA a injectar (RIPI/ β -gal) a una concentració de 2ng/ μ l va ser centrifugat a màxima velocitat (12000 rpm) durant 30 minuts. El procés de microinjecció es va fer en un microscopi Nikon TE-2000U amb l'ajuda de dues pipetes, la d'injecció amb el DNA i la de subjecció.

2.3.4. Aïllament del DNA genòmic dels ratolins

Fragments de cua, d'uns 0.5 cm, d'animals de tres setmanes d'edat es digerien en una solució tamponada (*solució de lisi*) que contenia proteinasa K (1 mg/ml) i SDS (0.2 % (p/vol)) i s'incubava a 56°C tota la nit. Aquesta incubació permet la digestió del teixit per la proteinasa K, alliberant-se el DNA genòmic de les cèl·lules. Posteriorment es purificava el DNA seguint el protocol següent: s'afegien 250 μ l d'una solució saturada de NaCl, es

centrifugava durant 15 minuts a 12000xg i es recuperava el sobrenadant. A partir d'aquest sobrenadant es precipitava el DNA genòmic mitjançant l'addició de 500µl d'isopropanol i es centrifugava de nou 15 minuts a 12000xg. Es descartava el sobrenadant mitjançant aspiració i posteriorment es rentava el *pellet* de DNA amb etanol 70%. Es tornava a centrifugar durant 10 min a 12000xg i es descartava de nou el sobrenadant per aspiració. Finalment el DNA es resuspensia en 500µl d'aigua miliQ, prèviament escalfada a 65°C per afavorir la resuspensió. El DNA obtingut s'analitzava posteriorment mitjançant *Southern Blot*.

Solució de lisi

Tris-HCl pH 8.5	100 mM
SDS	0.2 % (p/vol)
Proteinasa K	1 mg/ml
EDTA pH 8	5 mM
NaCl	200 mM

2.3.5. Anàlisi del DNA per Southern blot

2.3.5.1. Digestió i electroforesi del DNA genòmic

Es digerien 10 µg del DNA genòmic durant tota la nit a 37°C amb l'enzim de restricció adequat segons el transgen que es volgués analitzar (*BamHI* en el RIPI/β-Gal). El dia següent, s'afegia tampó de càrrega 10x (Glicerol 50%, EDTA 100mM, SDS 1% i blau de bromofenol 0,1%) al DNA genòmic digerit i es realitzava una electroforèsi en gels de l'1% d'agarosa/TAE 1x. En l'electroforèsi de DNA s'utilitzà com a marcador de pes molecular el *DNA Molecular Weight Marker X* (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Es deixaven córrer les digestions durant 4-5 hores entre 50-60 volts. Posteriorment es realitzava el tractament del gel per tal de permetre la transferència del DNA a la membrana de nylon, aquest tractament consisteix en: 15 minuts en una solució HCl 0.25M, per aconseguir la despurinització i assegurar la transferència al filtre dels fragments d'elevat pes molecular; 20 minuts en un solució alcalina (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) per tal de desnaturalitzar el DNA i facilitar-ne també la transferència; i un mínim de 20 minuts en una solució neutralitzant (1M Tris, 3M NaCl) que permetrà neutralitzar el pH i carregar negativament el DNA de nou.

TAE 1x

Tris-acetat	40 mM, pH 8.3
EDTA	1 mM
Bromur d'etidi	0.5 µg/ml

2.3.5.2. *Transferència del DNA a la membrana*

Després del tractament del gel d'agarosa es realitzava la transferència del DNA des del gel a membranes de nylon carregades positivament (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN - ref.1 417 240). El mètode de transferència utilitzat era el sistema Turboblotter® (Schleicher & Schuell, Kenne, New Hampshire). Aquest sistema permet la transferència del DNA mitjançant capil·laritat per pressió negativa en tampó d'alta força iònica (10xSSC) a través de papers absorbents (GB002 i GB004 - Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). La transferència es realitzava en un mínim de 2 hores, però es pot deixar també durant la nit. Un cop finalitzada, el DNA es fixava a la membrana de nylon mitjançant la irradiació de 120000µJ de llum ultravioleta un 25-50 segons, amb el sistema UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA). Aquesta irradiació permet la creació d'unions covalents entre el DNA i la membrana.

20xSSC

NaCl	3 M
Citrat sòdic	0.3 M, pH 7.4

2.3.5.3. *Marcatge radioactiu de les sondes de DNA*

Les sondes utilitzades en el *Southern Blot* es marcaven radioactivament amb [α -³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Corp., Arlington Heights, Ill). El marcatge es realitzava a partir del preparat comercial "Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP)" (ref. 27-2940-01, Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant. Un cop marcades, les sondes es filtraven mitjançant gel filtració en columnes de Sephadex G-50 (Probe Quant G-50 Micro Columns, Amersham Pharmacia Biotech), que permetien separar els nucleòtids radioactius no incorporats a la sonda i reduir així la radioactivitat inespecífica.

2.3.5.4. Hibridació de la membrana

A continuació es procedia a la realització de la prehibridació, durant unes 2 hores a 65°C. La *solució de prehibridació* conté principalment proteïnes, detergents com el SDS i ssDNA que bloquegen la membrana que no conté DNA fixat, reduint així la hibridació inespecífica. Posteriorment es realitzava la hibridació (*solució d'hibridació*) durant tota la nit amb la sonda marcada radioactivament (3-5.10⁶cpm/ml), en agitació rotacional a 65°C.

Solució de prehibridació i hibridació

Na ₂ HPO ₄	0.25 mM, pH 7.2
SDS	10% (p/vol)
EDTA	1 mM
Blocking reagent (Roche)	0.5% (p/vol) (ref. 1096176)

2.3.5.5. Rentats de la membrana i revelats

Després de la hibridació, les membranes es rentaven per eliminar la sonda en excés i la radioactivitat inespecífica que es mantingués unida a la membrana per unions molt dèbils. Es realitzaven 3 rentats consecutius, cada un d'una astringència superior: 2 rentats, de 10 minuts cada un, amb una solució de baixa astringència (2x SSC, 0.1% SDS), a 30°C en agitació rotacional; i un rentat de 15 minuts a 65°C en agitació rotacional amb una solució d'alta astringència (0.1x SSC, 0.1% SDS). Finalment, les membranes s'exposaven a una pel·lícula fotogràfica (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare) o a una pantalla radiosensible (Hypercassette Amersham) per tal d'obtenir la senyal que permetia la genotipació dels animals.

2.3.6. Anàlisi del DNA per PCR

L'anàlisi del DNA per PCR és un mètode que permet detectar els animals transgènics molt més ràpidament si es disposa dels primers adequats. La PCR s'utilitzava per la detecció dels animals transgènics RIPI/β-Gal.

A la PCR del β-Gal, els primers amplificaven una banda d'unes 261pb procedent del cDNA del gen quimèric. A més a més s'utilitzava el locus Rosa26 com a control positiu intern del DNA genòmic (410pb). D'aquesta manera en el cas dels ratolins control obteníem una sola banda, i en els ratolins transgènics n'obteníem dues, una que provenia del gen endogen Rosa26 i l'altre del transgen β-Gal. La seqüència dels primers i la seva localització és la següent:

2.4. Producció, purificació i caracterització dels vectors virals

2.4.1. Producció i purificació dels AAV

El mètode seleccionat per produir els AAV es basa en el protocol de transfecció amb tres plasmidis que permet obtenir preparacions virals lliures d'adenovirus contaminants (Xiao *et al.*, 1998). Es va realitzar una transfecció amb fosfat càlcic en cèl·lules HEK-293 creixent en medi DMEM (IMDM 2%, FBS 1% p/s) i cultivades en *roller bottles* (RB), amb 3 plasmidis alhora: 125 µg del vector plasmídic, que aporta el *cassette* d'expressió flanquejat per les ITRs virals; un segon plasmidi (125 µg) codificant per les proteïnes necessàries per a la replicació viral i les proteïnes de la càpside (pRepCap) i un tercer plasmidi pWEAD (150 µg) que aporta les funcions adenovirals necessàries per a la replicació del virus. Els plasmidis rep/cap i pWEAD van ser amablement proporcionats per la Dra. K. A. High, del *Children's Hospital of Philadelphia*, EE.UU. Es van utilitzar un total de 10 RB per cada preparació viral. Transcorregudes 48 hores es va recollir el medi i les cèl·lules, aquestes últimes van ser centrifugades 10 minuts a 2500g. El medi i les cèl·lules precipitades van ser tractades de manera diferent. Les cèl·lules van ser resuspeses en TBS (50mM TrisHCl, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, pH 8.0), van ser lisades en 3 cicles de congelació-descongelació i va ser centrifugat durant 30 minuts a 2500g. El sobrenedant resultant d'aquesta centrifugació va ser afegit al medi de cultiu inicial, les partícules virals van ser precipitades durant 15h amb el 8% de PEG 8000 (Sigma) i centrifugat 30 minuts a 2500g. Aquest precipitant que contenia els vectors virals provinents de les cèl·lules i del medi de cultiu, van ser ressuspesos en TBS (50mM TrisHCl, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, pH 8.0) i tractat amb benzonasa (Merck) durant 30 minuts a 37°C, posteriorment va ser centrifugat 10 minuts a 10000g.

A continuació es van purificar els vectors virals per ultracentrifugació en gradient de clorur de cesi (CsCl) seguint el protocol publicat pel laboratori (Ayuso *et al.*, 2010b). El sobrenedant va ser recuperat en tubs ultra de 37.5ml (Beckman) amb un gradient discontinu de CsCl amb dos densitats diferents (1.3 i 1.5 g/ml) i van ser centrifugats 17h a 28.000 rpm en el rotor SW28 (Beckman). Les bandes dels virus resultants van ser recollides acuradament amb una xeringa de 10ml i una agulla de 18G i transferides a un nou tub de 12.5ml amb un gradient de CsCl continu amb una densitat de 1.379g/ml. Els tubs van ser centrifugats durant 48h a 38.000 rpm en el rotor SW40Ti (Beckman). Finalment, la banda amb totes les partícules van ser recuperades, es van dialitzar amb PBS utilitzant una membrana de 10KDa (Slide-A-Lyzer Dialysis Products, Pierce) i es van filtrar en filtres de Millipore de 0.45 µm de diàmetre. Els PEG i el protocol de purificació basat en

el gradient de CsCl redueix significativament les càpsides dels AAV buides, el DNA i les impureses, de manera que augmenta la puresa dels AAVs i afectant als resultats *in vivo* amb una major transducció (Ayuso *et al.*, 2010c).

2.4.2. Producció i purificació dels adenovirus helper dependent (HdAd)

A la producció dels Adenovirus *helper* dependent o *Gutless* es van utilitzar cèl·lules derivades de les HEK-293 anomenades Cre116 (obtingudes de P. Ng, Baylor College of Medicine, EEUU), cèl·lules que expressen nivells més elevats de la recombinasa Cre i per tant, com a resultat disminueix la contaminació de *helper* virus (Hv) a les preparacions de virus finals (Palmer *et al.*, 2008). Per generar els vectors HdAd, es van transfectar 10µg de DNA linealitzat (digerit amb l'enzim de restricció PmeI) amb Fosfat de Calci en plaques de 60mm amb les cèl·lules Cre 116 al 70% de confluència i amb el medi de cultiu MEM al 10% de sèrum. A les 24 hores es va canviar el medi de cultiu a MEM al 5% de sèrum, per millorar la infectivitat dels helper virus (Hv), i es van afegir els Hv a una MOI de 5 pfu/ml. Els Hv utilitzats van ser proporcionats per F. Kreppel, Ulm University.

Després de 48h es va observar l'efecte citopàtic al microscopi, es van recollir les cèl·lules que contenien els virus se'ls hi va afegir 200 µl de sacarosa al 40% en un volum final de 2ml abans de ser guardats a -80°C (primera amplificació, P0). Per a fer la segona amplificació en una placa de 60mm (P1) es van fer tres cicles de congelació-descongelació dels virus i així obtenir el lisat cel·lular el qual es va centrifugar 15 minuts a 1500g. El sobrenedant amb els virus HdAd va ser recollit i es va deixar atemperar a 37°C. 500 µl del sobrenedant van servir per a la segona amplificació (P2), es va coinfectar noves plaques de 60mm amb les cèl·lules Cre116 al 70% de confluència i amb medi MEM al 5% de sèrum. A les 24h es va afegir una MOI de 2pfu/ml de Hv. A les 48h es van recollir les cèl·lules i es van lisar amb els 3 cicles de congelació-descongelació. I així successivament repetides amplificacions en plaques més grans de 150mm (P3 i P4) utilitzant partícules virals de l'anterior pas i Hv addicionals en cèl·lules Cre116. La quantitat de Hv addicionals va ser ajustat segons les observacions microscòpiques de l'efecte citopàtic a les 48h de la infecció. De les plaques petites (P0, P1 i P2) de 60mm es va passar directament a una placa de 150mm (P3). I d'aquesta ultima placa es van infectar 20 plaques de 150mm per cada virus per la ultima amplificació (P4). De les 20 plaques es van recollir tots els virus juntament amb les cèl·lules Cre116. Va ser centrifugat 5 minuts a 750g. Finalment es van ressuspendre el precipitat amb PBS⁺⁺ (amb Calci i Magnesi) i amb el 10% de Glicerol. Van ser congelats a -80°C per posteriorment ser purificats.

A continuació es van purificar els vectors virals per ultracentrifugació en gradient de clorur de cesi (CsCl). Les cèl·lules es van lissar a través de 3 cicles de congelació-descongelació i es va centrifugar 15 minuts a 1500g. Es va començar a preparar el primer gradient discontinu de CsCl en tubs ultra clear (Beckman) a una densitat mínima de 1.27 g/ml i una màxima de 1.41 g/ml on es va afegir el sobrenedant. Es va ultracentrifugar durant 2h a 32.000 rpm a 18°C. Després de la centrifugació els Adenovirus i els Hv van ser visibles on hi havia la separació entre els gradients. La banda dels virus va ser recollida amb una xeringa de 10ml i una agulla de 18G es va transferir en un segon gradient continu de 1.34 g/ml de densitat. Després de centrifugar 20 h 32.000 rpm i a 18°C es van obtenir dues bandes, la superior corresponent als Adenovirus i la inferior als Hv. Es va punxar la banda superior amb els Adenovirus amb una xeringa de 10 ml i una agulla de 18G per posteriorment ser purificats en una columna d'exclusió molecular PD-10 (GE Healthcare). Un cop rentada la columna amb 25 ml de PBS es van afegir els virus a la columna amb un volum màxim de 2.5 ml. Els primers 3.5 ml es van descartar ja que contenien les proteïnes i lípids. Es van tornar a afegir 5 ml de PBS a la columna. Posteriorment es van recollir fraccions de 1 ml de volum, on a la segona i tercera contenien els virus d'interès, la resta de fraccions van ser eliminades. Es van unificar els virus en un volum final de 2 ml i amb el 10% de glicerol estèril per criopreservar a -80°C.

2.4.3. Quantificació dels vectors virals per PCR quantitativa

2.4.3.1. Quantificació dels AAV per PCR quantitativa

El títol dels AAVr van ser determinats per PCR quantitativa seguint el protocol descrit per *AAV2 Reference Standard Material* utilitzant el plasmidi de DNA linealitzat com a corba estàndard (Lock *et al.*, 2010). La quantificació de cada vector es va comparar amb varis vectors de referència amb concentració coneguda per garantir la validesa dels resultats. Un dels vectors de referència utilitzats en aquest treball va ser el *AAV2 Reference Standard Material AAV2RSS* (Lock *et al.*, 2010).

En els AAV, per assegurar que el títol del vector viral no es sobreestimava a causa de la presència de plasmidis de DNA restants a la preparació viral, es va realitzar un tractament amb DNAsa abans de la quantificació. Per tant, es van afegir 5 µl de cada preparació del vector viral amb 44,5 µl de tampó de DNAsa (13 mM Tris, pH 7,5; MgCl₂ 5 mM) i 0,5 µl de DNAsa (10 U) i es va incubar 30 min a 37 °C.

La quantificació dels vectors virals va ser realitzada per PCR quantitativa amb TaqMan LightCycler® 480 Probe Master (Roche (Indianapolis, Indiana, EEUU)).

Cada reacció contenia la mix de la PCR (TaqMan LightCycler® 480 Probe Master, Roche) 10 µl:

Reacció TaqMan

0.2 µl TaqMAN
 1 µl *primer fwd* (10 µM)
 1 µl *primer rev* (10 µM)
 2.8 µl H₂O MiliQ
 5 µl vector diluït

La reacció va consistir en una desnaturalització inicial de 10 segons a 95°C i 45 cicles de desnaturalització (10 segons a 95°C), *annealing* (30 segons a 60°C) i amplificació (1 segon a 72°C).

Els primers utilitzats en la quantificació dels genomes virals dels AAV van ser:

Fwd: AGC AAT AGC ATC ACA AAT TTC ACA A

Rev : CA GAC ATG ATA AGA TAC ATT GAT GAG TT

Sonda: AGC ATT TTT TTC ACT GCA TTC TAG TTG TGG TTT GTC – FAM

I s'obtingueren els següents valors després de la qPCR:

Vector viral AAV	gv/ml
AAV9-Elastasa-seAP	2 x 10 ¹³
AAV9-Elastasa-Pdx1	2.2 x 10 ¹³
AAV9-Elastasa-Neurog3	2.7 x 10 ¹³
AAV9-Elastasa-MafA	1.1 x 10 ¹³
AAV9-Elastasa-Nul	6.2 x 10 ¹³

2.4.3.2. Quantificació dels HdAd per PCR quantitativa

En els HdAd, la càpside viral es va digerir amb la proteïnasa K. Aquest enzim digereix les proteïnes de la càpside provocant l'alliberament del DNA del vector viral per ser quantificat. 10 µl dels vectors HdAd purificats es van incubar amb la solució de la proteïnasa K tamponada (proteïnasa K, 10 mg / ml, Tris 50 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 8,0) durant 3 hores a 37°C.

Els primers utilitzats en la quantificació dels genomes virals dels HdAd van ser:

- *Primers* que amplifiquen la regió humana HPRT dels HdAd:

HPRT fwd: 5' - GGGCATAAAGGGTTTTAATGG - 3'

HPRT rev: 5' - AACTATCAACCTCATCCTCTCCA - 3'

- *Primers* específics per a la quantificació dels Adenovirus *helper* (Hv):

Fiber fwd: 5' - ATGAAGCGCGCAAGACCGTCT - 3'

Fiber rev: 5' - TGAGCGCAAGCATGCCATTGG - 3'

S'obtingueren els següents valors després de la qPCR:

Vector viral HdAd	pv/ml	%Hv
HdAd-CMV-GFP	3×10^{11}	1.5
HdAd-Elastasa-GFP	4.8×10^{11}	5.8
HdAd-hIns-seAP	2.7×10^{11}	1.6

2.4.4. Quantificació de les càpsides virals AAV per silver staining

L'anàlisi de les preparacions virals per electroforesi de proteïnes SDS-PAGE i la posterior tinció amb nitrat de plata permet la quantificació de les càpsides virals, un altre títol per poder comparar amb el títol dels genomes virals (veure apartat anterior). A més a més, aquest mètode ens permet saber el grau de contaminació de proteïnes no virals que podrien afectar l'eficiència de transducció in vivo.

Breument, el volum apropiat del vector d'interès i diferents dilucions del vector de referència es barregen amb el *buffer* 2x Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Invitrogen) i 10x NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen) fins a un volum final de 20 µl. Després de 5 minuts d'ebullició, les mostres es van carregar en el gel al 10% Novex® Tris-GlycineMini Gel (Invitrogen) a 125 V durant 1.5-2 hores. Posteriorment, el gel va ser tenyit amb SilverXpress® Silver Staining Kit (Invitrogen), seguint les instruccions de la casa comercial.

2.5. Anàlisi del nombre de còpies del transgèn

2.5.1. Extracció del DNA genòmic

L'aïllament del DNA genòmic per a la quantificació del nombre de còpies dels animals transgènics RIPI/ β -Gal es va realitzar a partir d'un fragment de cua del ratolí (0.5 cm) amb el kit comercial *MasterPure™ DNA Purification Kit* (Epicentre Biotechnologies, Chicago, IL, EEUU) seguint les indicacions de la casa comercial.

2.5.2. Quantificació del nombre de còpies del transgèn per qPCR

El valor final del nombre de còpies del transgèn s'obtenia a partir de la comparació de 20ng de DNA genòmic dels ratolins transgènics amb una recta patró de referència generada a partir de dilucions seriades del plasmidi RIP-I/ β -Gal linealitzat.

2.5.2.1. Generació de la recta patró de referència.

La recta patró es va generar a partir del DNA plasmídic RIP-I/ β -Gal linealitzat. Sabent la concentració del plasmidi i el nombre de parells de bases del constructe (9118pb) s'obtenia el nombre de còpies del transgèn per μ l. Aquest DNA plasmídic es dilueix de forma seriada de manera que tinguem una recta patró de dilucions logarítmiques $10^7 : 10^6 : 10^5 : 10^4 : 10^3 : 10^2$ còpies de transgèn/ μ l. A cada reacció de PCR es combinava el DNA plasmídic amb 20ng de DNA genòmic total irrellevant (no transgènic) de ratolí amb la finalitat d'igualar les condicions de PCR entre la recta patró i el DNA genòmic dels ratolins transgènics.

2.5.2.2. Quantificació del nombre de còpies del transgèn per qPCR

Un cop generada la recta patró i diluïdes les mostres es va realitzar la RT-qPCR per al càlcul del nombre de còpies del transgèn.

Cada reacció de qPCR (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche) contenia 20 μ l de volum total:

Reacció SYBR Green I

10 μ l SYBR Green I Master
 0.4 μ l *primer fwd* (10 μ M)
 0.4 μ l *primer rev* (10 μ M)
 8.2 μ l H₂O MiliQ
 1 μ l DNA genòmic

- La seqüència dels primers RIP-I utilitzats era:

RIP-I fwd: 5'- TACATGTCCTGCTGCCTGAG - 3'

RIP-I rev: 5' - TTTCCTTGGCTGAGCACTTT - 3'

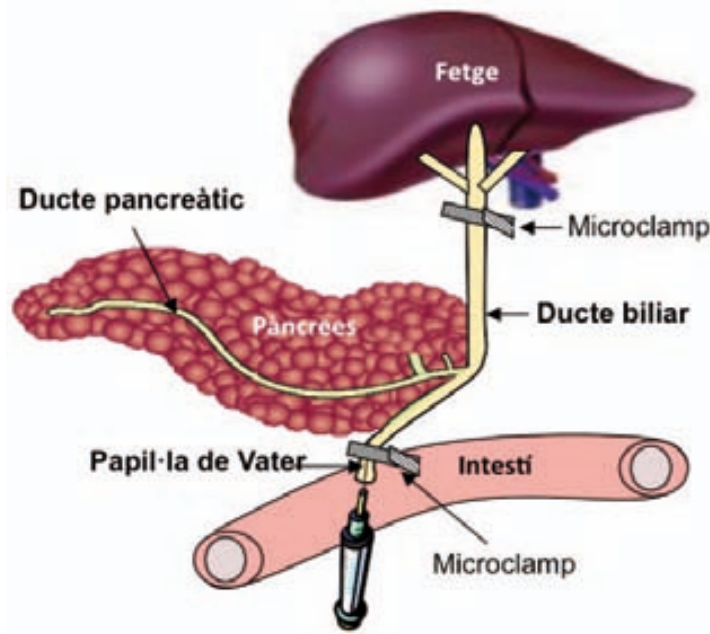
La reacció consisteix en 5 minuts a 95°C per una desnaturalització inicial i 45 cicles de 4 etapes: desnaturalització (10 segons a 95°C), *annealing* (10 segons a 60°C) amplificació (10 segons a 72°C) i 30 segons a 60°C. Abans de refredar la reacció a 4°C, 5 segons a 95°C i 1 minut a 65°C per determinar la temperatura de *melting*.

Els valors obtinguts de la qPCR en relació a la recta patró ens proporcionen el nombre de còpies del transgèn que teníem en 20ng de DNA genòmic total. I sabent que 20ng de DNA genòmic corresponen a 3115.26 cèl·lules diploides al ratolí, obteníem el valor del nombre de còpies del transgèn per cèl·lula diploide.

2.6. Injecció *in vivo* dels vectors virals

2.6.1. Administració retrògrada pel ducte pancreàticobiliar.

La injecció retrògrada pel ducte pancreàticobiliar va ser realitzat seguint el protocol descrit per Loiler i col·laboradors (Loiler *et al.*, 2005) amb petites modificacions. Els animals es van anestesiar mitjançant una injecció intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) i xilacina (10 mg/kg). Es va afaitar la zona ventral del ratolí i es va realitzar una incisió de 2-3 cm a través de la línia mitjana, començant a l'alçada del cartílag xifoides i continuant cabdalment. Tot seguit, es va procedir a l'obertura de l'abdomen per mitjà d'una incisió a través de la línia alba i es va col·locar un separador abdominal. Amb cura, es van exposar al camp quirúrgic el duodè i el cap del pàncrees, identificant-se el ducte biliar. Es van apartar els lòbuls del fetge i es va pinçar el ducte biliar cabdalment al fetge, a la zona de bifurcació de la triada hepàtica per tal de prevenir la disseminació del vector viral al fetge. Posteriorment, es va introduir una agulla de 30G a través de la papil·la de Vater i es va avançar retrògradament pel ducte biliar. L'agulla es va fixar pinçant el ducte a l'alçada de l'intestí per assegurar la seva posició i evitar la fuga de vectors virals a l'intestí. Lentament, es va injectar un volum total de 100 µl amb la dosi corresponent de vectors virals. Un minut després de la injecció, es va retirar la pinça que assegurava l'agulla i es va aplicar una gota d'adhesiu quirúrgic veterinari Vetseal (Braun) al punt d'entrada de l'agulla. Aproximadament dos minuts després es va retirar la pinça del ducte biliar i es va suturar la paret abdominal i la pell. Els ratolins es van deixar recuperar de la anestèsia a una manta calefactora per evitar la pèrdua de temperatura.



?

2 MAGDf ° x22RCGRFRUVP d2RFLÀRQ HVPD2AR0D2SRG UMD2 2D2PÍ 00 PDP d2AR0Q PGÍ PDQ C2CRG2D2D2 URPP d2 UVGDAÀPVD0GRVQ; MDA2ARÈRPÍ GFÈ GDFD0CHUPGRRF0DAGDZFAROPI UAÀPVRÈ ODG22 2l dfqG2Fel r.í 22ó2 àeq.l d02Tl 222ú r ieq. 2 2d 2í 02ue2b 2h hT0 2ue22 .edF. 2E r. 2Fr 2tF0 2ue2/82,222h2c ed2T 2ql qo c h22ó2 ql 2d q 2 2ql ruFq.e2AT d2 2 r. 2b 2q2qFo q2G2 2óFo d2q h2 22e.2e222 222etl r 2hT p 22F. 2E 2hed2B d2b 2 ú tF0 2ue2b 2edFt 2c A2222eq.l d02Tl 22hed2àT d2b 222óe2c 2r q2G2ue22eq.l d02Tl 222q h2 222r.eó.g2

?

3x 2x22o 2 2V0 222p22 0 2322 i V22

2 2 2ul 2T2q ddeóhl rer. 2ue22eq.l d02Tl 2222 r 222ed2u2FM62 c A2222222' c A222 22222 2 trnó2S2F 222 2Fr 2al dFc 2l. 2ue228822222 22ed2F ieq. 2hed2b 22er 2FtFo d2l 2hed2b 22er 2 o.ed 22ue2b 22qF, 22F r 22222 22F ieq. d2hed2b 22er 2FtFo d22e22 r 2c 222222 2r 2reó.eóT d2 c Ti rp r. 2Fr 2F ieqq2G2F.d hedTl rT 2ue2De. c 2r 298822 tOd2S22222 2qF 29822 tOd2S,22r 2 ql h2ul dc T02222 22ed2Fr 2ue2T 2r q2G222 22 2r 22.edl xsl r. 222222 2Fr.d uF222Fr 2tF0 2 ue2/8222c A222222F022 22er 2FtFo d,22Fd r. 2Fr 2r 2F. 22222 2r 2F ieq. d222222F0,222F 2 er. 2 e222 22F.Fd d2b 2h de. 22FAqF.yr T 222 2hed22

2 2F r 22222 2F ieq. d2hed2b 22er 22.ed 22ue2b 22qF 22222 r 2c 222l 22 22ed22eqeóydt 2 reó.eóT,22A r 222ue2b 22F ieqq2G22222 r 2c 2222 r 222ed22Bhl 2. 222Fr 222c 2r F. 2222l. 2Fr 222Fc 2 uF2sd dl 2 2ue221822 222a 222hó2hed2 222Fe222222.eó2T 22222 2l 222 2r 2F22 22222 2q2F d2Nq2í 22 22o 222er 2hed2o 22qF, 2222222 2r 2ql 2d q d22e22 r 2c 222er 2Fr 2i 22nci 22m i 22ue222h2yó. 2q2hed2 2c l A222E d2d 222 2q2F d2b 2F ieqq2G,22222 2r 2Fr. 2E d2tF22e22ue2/82,2

?

?

?

?

2.7. Anàlisi d'expressió del mRNA per qPCR

2.7.1. Extracció de RNA total

Les mostres de teixits per a l'obtenció de RNA total van ser obtingudes dels animals just sacrificats i van ser ràpidament congelats en nitrogen líquid. Els teixits congelats van ser homogeneïtzats (Polytron® MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mullheim, Alemanya) amb 1 ml de la solució TriPure Isolation Reagent (Roche, 11667) i seguint el protocol comercial de purificació de RNA en columna de Rneasy Mini Kit de QIAGEN (Cat.No.74104, QIAGEN, Invitrogen) es va obtenir el RNA total. Aquest mètode es basa en l'extracció de fenol-cloroform dels teixits homogeneïtzats utilitzant Tiocianat com a inhibidor de ribonucleases.

Totes les mostres van ser tractades a les columnes amb DNaseI (RNase-Free DNase Set proporcionat amb les columnes, Qiagen) i, després de ser eliminada amb el *buffer* subministrat pel fabricant, van ser eluïdes amb 30 µl d'aigua destil·lada lliure de RNases (DEPC).

Finalment, la concentració de RNA obtingut es va determinar mitjançant l'ús d'un Nanodrop (ND-1000, ThermoCientific).

2.7.2. Síntesi de cDNA

Un µg de RNA total va ser retrotranscrit a cDNA utilitzant el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) seguint les instruccions del fabricant. Oligo-dT i oligonucleòtids hexàmers aleatoris van ser utilitzats com a encebadors a la reacció en presència d'un protector del inhibidor de la RNasa.

2.7.3. PCR quantitativa (qPCR)

La PCR quantitativa o *Real-time* PCR (RT-PCR) ha esdevingut molt útil en l'anàlisi de l'expressió del mRNA de diversos gens. La RT-PCR es va fer en el LightCycler® 480 (Roche) utilitzant LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche). A la següent taula es mostren els diferents encebadors de ratolí (m) o humà (h) utilitzats a la RT-PCR:

Gen	Seqüència Fwd	Seqüència Rev
<i>β-Gal</i>	ATGGGTAACAGTCTTGGCGG	GGCGTATCGCCAAAATCACC
<i>mPDX1</i>	GAAATCCACCAAAGCTCACG	CGGGTTCGCTGTGTAAG
<i>mNgn3</i>	CGCAAGAAGGCCAATGATCG	CCAGATGTAGTTGTGGGCGA
<i>mMafA</i>	CTCCAGAGCCAGGTGGAG	GTACAGGTCCCGCTCCTTG
<i>mIns1</i>	GGCATTGTGGATCAGTGCT	AGGTGGGCCTTAGTTGCAG
<i>mIns2</i>	ACCTTTGTGGTTCCACCTG	GGTCTGAAGGTCACCTGCTC
<i>mGcg</i>	GGCACATTCACCAGCGACTA	GTCCCTTCAGCATGCCTCTC
<i>mGk</i>	CTGGATGACAGAGCCAGGAT	CTCTGCCAGGATCTGCTCTAC
<i>mGlut2</i>	CTGGAGCCCTCTTGATGGGA	CCAGTCTGAAATTAGCCCACA
<i>mIAPP</i>	GATGTGCATCTCCAAACTGC	TTGTCCATCTGAGGGTTGCTA
<i>mNeuroD1</i>	AACCGCCAGCGCTTCCTTCC	AGCTGCGCTGTAGGCGTGTG
<i>hSeAP</i>	AGCAGGGCTTACCGGGCACT	TGGTCGGCAGTGACGAGGCT
<i>mRplpo</i>	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG

Cada reacció de qPCR (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche) contenia 20 µl de volum total:

Reacció SYBR Green I

10 µl SYBR Green I Master
 0.4 µl primer fwd (10 µM)
 0.4 µl primer rev (10 µM)
 7.2 µl H₂O MiliQ
 2 µl cDNA (dil.1/10)

La reacció consisteix en 5 minuts a 95°C per una desnaturalització inicial i 45 cicles de 4 etapes: desnaturalització (10 segons a 95°C), *annealing* (10 segons a 60°C) amplificació (10 segons a 72°C) i 30 segons a 60°C. Abans de refredar la reacció a 4°C, 5 segons a 95°C i 1 minut a 65°C per determinar la temperatura de *melting*.

Hem utilitzat el mètode *delta-delta-Ct* (2- $\Delta\Delta Ct$) descrit per Livak (Livak *et al.*, 2001) per quantificar l'expressió relativa dels gens d'interès. Mètode àmpliament utilitzat on s'assumeix una duplicació òptima de cada cicle de PCR amb una taxa d'amplificació del 100%. Amb aquest mètode, les Ct (indica el nombre de cicles al qual la quantitat del gen diana d'interès es amplifica) del gen diana d'interès a les mostres de l'assaig i les mostres de referència son ajustades en relació a les Cts del gen pel qual es normalitza (*housekeeping*) per cada una de les mostres. El valor resultant servirà per determinar la diferència d'expressió.

2.8. Anàlisi de l'expressió de la β -Galactosidasa

Per detectar l'expressió de la β -Galactosidasa en cèl·lules (INS-1) i en teixits (pàncrees) *in toto* es va utilitzar un mètode colorimètric i qualitatiu de l'activitat enzimàtica. Les mostres van ser fixades 1h amb paraformaldehid al 4% i rentades amb PBS dues vegades. Posteriorment van ser incubades amb el reactiu X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosid) en 5mM $K_3Fe(CN)_5$, 5mM $K_4Fe(CN)_6$ i 1mM $MgCl_2$ en PBS durant unes hores (1-2 h en cèl·lules i 6-8 h en teixits) a 37°C i protegides de la llum visible. Quan es va observar el canvi de color (blau) es va aturar la reacció eliminant el reactiu i rentant amb PBS.

2.9. Determinació de paràmetres sèrics

El sèrum s'obtenia o bé a partir de mostres de sang obtingudes per la cua; o bé a partir de la decapitació dels ratolins en els estudis a temps final. En tots dos casos la sang es recollia en tubs no heparinitzats i es deixava durant 1 h a 4°C. Posteriorment, es va centrifugar 5 minuts a 14.000 g a 4°C per a l'obtenció del sèrum, aquest es mantenia congelat (-20°C) fins al moment de la determinació dels diferents paràmetres.

2.9.1. Glucosa

Els nivells de glucosa sèrica es determinaren a partir d'una gota de sang (5 μ l) procedent de la cua de dels ratolins, mitjançant el sistema Glucometer Elite TM (Bayer, Leverkusen, Alemanya). Es van considerar animals diabètics a partir de dues mesures consecutives de la glicèmia \geq 250 mg/dl.

2.9.2. Insulina

La insulina circulant es va determinar a partir de 100 μ l de sèrum de mostres de sang a punt final per radioimmunoassaig (RIA) mitjançant el kit *Rat Insulin* (Millipore) seguint les instruccions del fabricant. La insulina de ratolí té una reactivitat creuada del 100% comparada amb la de rata. Aquest mètode té un límit de sensibilitat de 0.081 ng/ml i una variació intrassaig màxima del 10%. En condicions de dejú els valors d'insulina ha d'estar entre 0.5 i 2 ng/ml.

2.9.3. seAP

Els valors circulants de la Fosfatasa Alcalina (seAP) es van determinar a partir de 10 µl de sèrum a través d'un mètode luminomètric, Topix® Phospha-Light™ System (Applied Biosystems, Inc). La SeAP utilitzada en aquest treball és la forma truncada de la fosfatasa alcalina placentària humana (PALP) la qual pot ser discriminada de la seAP endògena del ratolí per temperatura, incubant el sèrum 30 minuts a 65°C. Aquest pretractament assegura una inactivació de la seAP endògena i no la seAP placentària derivada del transgèn ja que és termoresistent. Per a la determinació dels nivells de seAP s'han seguit les indicacions del fabricant.

2.10. Test de tolerància a la glucosa

El test de tolerància a la glucosa s'utilitza per comprovar si els ratolins són capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de glucosa, valorant així el nivell de tolerància al sucre. Aquells animals que mantenen les glucèmies elevades i no recuperen els nivells basals de glucosa durant el temps de realització del test són considerats animals intolerants a la glucosa. Els animals escollits per a la realització del test es dejunaven 16 hores abans, passades les hores de dejuni es pesaven i es determinava la glucèmia basal a partir d'una gota de sang de la vena de la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite®. Posteriorment se'ls injectava intraperitonealment uns dosi de 2 g de glucosa/Kg de pes viu. A partir d'aquest moment es realitzaven extraccions de sang seriades als 15 i 30 minuts després de la injecció de la glucosa i posteriorment cada 30 minuts fins a les 2 hores de l'inici del test per tal de determinar l'evolució de la glucèmia al llarg del temps. Durant aquest procés els animals no tenien accés ni al menjar ni a l'aigua. Els resultats s'expressen com les glucèmies en mg/dl en els diferents punts de l'experiment.

2.11. Inducció de la diabetis experimental mitjançant STZ

L'Estreptozotocina (STZ) és un antibiòtic d'ampli espectre derivat de *Streptomyces arhomogenes* d'estructura constituïda per una molècula de N-metil-N-nitrosurea unida al C-2 de la D-Glucosa. És un tòxic que actua majoritàriament a la cèl·lula β pancreàtica, a les quals destrueix. El mecanisme de toxicitat sobre aquestes cèl·lules es dona a través del reconeixement del transportador de glucosa GLUT2, la part d'estructura similar a la

glucosa que té aquesta droga permet l'entrada a les cèl·lules que tenen aquest mateix sistema de transport.

L'estreptozotocina es dissol en una solució de citrat sòdic 10 mM amb 0.9 % NaCl, pH 4.5, immediatament abans de la seva administració. S'administren 5 dosis consecutives de STZ via intraperitoneal de 50 mg/Kg de pes corporal cada una provocant una diabetis oberta. També es pot administrar una única dosi de 150 mg/Kg de pes corporal provocant el mateix efecte.

2.12. Anàlisi immunohistoquímic del pàncrees

Els pàncrees dels ratolins es fixaren amb una solució tamponada de formol al 10% durant 24 hores a 4°C i a continuació s'inclouen en parafina (inclusor tipus Histokinette) i se n'obtenien seccions (2-3µm) amb l'ajut d'un microtom, les quals posteriorment es desparafinaven (2 rentats amb Xilol 10 minuts, 2 rentats amb etanol 100% 5 minuts i 2 rentats d'etanol 96% 5 minuts) es procedeix a la seva tinció. Les seccions s'incubaren durant tota la nit a 4°C amb els anticossos primaris corresponents: contra insulina (1/100), contra β-Gal (1/100), contra GFP (1/300) contra PDX1 (1/20), contra MafA (1/75) i contra glucagó (1/100). Posteriorment s'incubaren amb els corresponents anticossos secundaris (1/300) i streptavidina conjugada amb fluoròfors en el cas de les immunohistoquímiques en fluorescència (1/300). Com a cromogen en els estudis en camp clar s'utilitzà la diaminobenzidina (DAB). Tots els anticossos utilitzats són escrits anteriorment en la part de Materials.

2.13. Quantificació de la transducció al pàncrees

La transducció al pàncrees es va quantificar a diferents punts després de la injecció intraductal dels vectors virals HdAd (5, 15 i 30 dies). A cada punt del temps analitzats es van sacrificar animals control i injectats amb els vectors virals que expressaven GFP. Els teixits van ser inclosos en parafina per realitzar les corresponents immunofluorescències i quantificar la transducció.

La detecció de GFP es va realitzar en tres seccions de pàncrees per animal (3-4 animals per grup; seccions separades 200µm). La quantificació de la transducció al pàncrees exocrí es va realitzar a partir de 10 camps a l'atzar per secció. L'àrea exocrina transduïda i l'àrea total de cada camp es van determinar per anàlisi d'imatges amb un

microscopi (Eclipse E800; Nikon, Tòquio, Japó) connectat a una càmera de vídeo i un analitzador d'imatges (analySIS 3.0; Soft Imaging System, Center Valley, PA, EEUU). El percentatge de pàncrees exocrí transduït es va calcular dividint l'àrea exocrina transduïda per l'àrea total exocrina. El percentatge de cèl·lules β transduïdes dels illots es va calcular dividint el nombre de totes les cèl·lules insulina i GFP doble positives de l'illot per el nombre de cèl·lules positives per insulina del mateix illot.

2.14. Determinació de la massa de cèl·lula β

La massa de cèl·lula β va ser calculada multiplicant el pes del pàncrees total pel % de l'àrea de cèl·lula β . L'àrea de cèl·lula β al pàncrees era calculada a partir de tres seccions separades 200 μ m marcades amb insulina, dividint l'àrea de totes les cèl·lules insulina⁺ de cada secció entre l'àrea total de la secció corresponent utilitzant el mateix analitzador d'imatges (analySIS 3.0; Soft Imaging System, Center Valley, PA, EEUU).

2.15. Anàlisi estadístic

Els resultats s'expressen com a la mitja \pm error estàndard de la mitja. La comparació dels resultats es realitza mitjançant el test t de Student de dades no aparellades o a través de la taula ANOVA de dos factors. les diferències es consideren estadísticament significatives amb * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Ackermann, A. M., and Gannon, M. (2007). Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* **38**(1-2), 193-206.

Agudo, J., Ayuso, E., Jimenez, V., Salavert, A., Casellas, A., Tafuro, S., Haurigot, V., Ruberte, J., Segovia, J. C., Bueren, J., and Bosch, F. (2008). IGF-I mediates regeneration of endocrine pancreas by increasing beta cell replication through cell cycle protein modulation in mice. *Diabetologia* **51**(10), 1862-72.

Akinci, E., Banga, A., Greder, L. V., Dutton, J. R., and Slack, J. M. (2012). Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (beta) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. *Biochem J* **442**(3), 539-50.

Al-Quobaili, F., and Montenarh, M. (2008). Pancreatic duodenal homeobox factor-1 and diabetes mellitus type 2 (review). *Int J Mol Med* **21**(4), 399-404.

Alba, A., Puertas, M. C., Carrillo, J., Planas, R., Ampudia, R., Pastor, X., Bosch, F., Pujol-Borrell, R., Verdaguer, J., and Vives-Pi, M. (2004). IFN beta accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to beta cells in nondiabetes-prone mice. *J Immunol* **173**(11), 6667-75.

Alba, R., Bosch, A., and Chillon, M. (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* **12 Suppl 1**, S18-27.

Andrali, S. S., Sampley, M. L., Vanderford, N. L., and Ozcan, S. (2008). Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem J* **415**(1), 1-10.

Andralojc, K., Srinivas, M., Brom, M., Joosten, L., de Vries, I. J., Eizirik, D. L., Boerman, O. C., Meda, P., and Gotthardt, M. (2012). Obstacles on the way to the clinical visualisation of beta cells: looking for the Aeneas of molecular imaging to navigate between Scylla and Charybdis. *Diabetologia* **55**(5), 1247-57.

Aoki, Y., Cioca, D. P., Oidaira, H., Kamiya, J., and Kiyosawa, K. (2003). RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**(1-2), 96-102.

Arlt, M. J., Born, W., and Fuchs, B. (2012). Improved visualization of lung metastases at single cell resolution in mice by combined in-situ perfusion of lung tissue and X-Gal staining of lacZ-tagged tumor cells. *J Vis Exp*(66), e4162.

Association, A. D. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **36 Suppl 1**, S67-74.

Ayuso, E., Chillon, M., Agudo, J., Haurigot, V., Bosch, A., Carretero, A., Otaegui, P. J., and Bosch, F. (2004). In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **15**(8), 805-12.

Ayuso, E., Chillon, M., Garcia, F., Agudo, J., Andaluz, A., Carretero, A., Monfar, M., Moya, M., Montane, J., Otaegui, P. J., and Bosch, F. (2006). In vivo gene transfer to healthy and diabetic canine pancreas. *Mol Ther* **13**(4), 747-55.

Ayuso, E., Mann, C., Anguela, X., and Bosch, F. (2010a). Aproximaciones de terapia génica para la diabetes tipo 1. *Avances en Diabetología* **26**(1).

Ayuso, E., Mingozi, F., and Bosch, F. (2010b). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther* **10**(6), 423-36.

Ayuso, E., Mingozi, F., Montane, J., Leon, X., Anguela, X. M., Haurigot, V., Edmonson, S. A., Africa, L., Zhou, S., High, K. A., Bosch, F., and Wright, J. F. (2010c). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther* **17**(4), 503-10.

Balmadrid, B., and Kozarek, R. (2013). Prevention and management of adverse events of endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastrointest Endosc Clin N Am* **23**(2), 385-403.

Banga, A., Akinci, E., Greder, L. V., Dutton, J. R., and Slack, J. M. (2012). In vivo reprogramming of Sox9+ cells in the liver to insulin-secreting ducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(38), 15336-41.

Banga, A., Greder, L. V., Dutton, J. R., and Slack, J. M. (2013). Stable insulin-secreting ducts formed by reprogramming of cells in the liver using a three-gene cocktail and a PPAR agonist. *Gene Ther*.

Bartoli, M., Poupiot, J., Goyenvalle, A., Perez, N., Garcia, L., Danos, O., and Richard, I. (2006). Noninvasive monitoring of therapeutic gene transfer in animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther* **13**(1), 20-8.

Batterham, R. L., Le Roux, C. W., Cohen, M. A., Park, A. J., Ellis, S. M., Patterson, M., Frost, G. S., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2003). Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(8), 3989-92.

Bedoya, F. J., Solano, F., and Lucas, M. (1996). N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* **52**(4), 344-7.

Begg, D. P., and Woods, S. C. (2013). Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective. *Adv Physiol Educ* **37**(1), 53-60.

Bernstein, B. E., Meissner, A., and Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* **128**(4), 669-81.

- Bessis, N., GarciaCozar, F. J., and Boissier, M. C. (2004). Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* **11 Suppl 1**, S10-7.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6), 1513-23.
- Bonal, C., and Herrera, P. L. (2008). Genes controlling pancreas ontogeny. *Int J Dev Biol* **52**(7), 823-35.
- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y. D., Giovannoni, L., Parnaud, G., and Berney, T. (2010). Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* **59**(5), 1202-10.
- Bramswig, N. C., Everett, L. J., Schug, J., Dorrell, C., Liu, C., Luo, Y., Streeter, P. R., Naji, A., Grompe, M., and Kaestner, K. H. (2013). Epigenomic plasticity enables human pancreatic alpha to beta cell reprogramming. *J Clin Invest* **123**(3), 1275-84.
- Brissova, M., Fowler, M. J., Nicholson, W. E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D. M., and Powers, A. C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* **53**(9), 1087-97.
- Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A. J., Deghenghi, R., and Ghigo, E. (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(10), 5083-6.
- Broglio, F., Gottero, C., Benso, A., Prodam, F., Volante, M., Destefanis, S., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A. J., and Ghigo, E. (2003). Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine* **22**(1), 19-24.
- Brom, M., Andralojc, K., Oyen, W. J., Boerman, O. C., and Gotthardt, M. (2010). Development of radiotracers for the determination of the beta-cell mass in vivo. *Curr Pharm Des* **16**(14), 1561-7.
- Brunetti-Pierri, N., Liou, A., Patel, P., Palmer, D., Grove, N., Finegold, M., Piccolo, P., Donnachie, E., Rice, K., Beaudet, A., Mullins, C., and Ng, P. (2012). Balloon catheter delivery of helper-dependent adenoviral vector results in sustained, therapeutic hFIX expression in rhesus macaques. *Mol Ther* **20**(10), 1863-70.
- Brunetti-Pierri, N., and Ng, P. (2008). Progress and prospects: gene therapy for genetic diseases with helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Ther* **15**(8), 553-60.
- Brunetti-Pierri, N., and Ng, P. (2009). Progress towards liver and lung-directed gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors. *Curr Gene Ther* **9**(5), 329-40.

- Brunetti-Pierri, N., and Ng, P. (2011). Helper-dependent adenoviral vectors for liver-directed gene therapy. *Hum Mol Genet* **20**(R1), R7-13.
- Brunetti-Pierri, N., Palmer, D. J., Beaudet, A. L., Carey, K. D., Finegold, M., and Ng, P. (2004). Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates. *Hum Gene Ther* **15**(1), 35-46.
- Budd, G. C., Pansky, B., and Glatzer, L. (1993). Preproinsulin mRNA in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**(2), 463-9.
- Buning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* **10**(7), 717-33.
- Burdette, J. E. (2008). In vivo imaging of molecular targets and their function in endocrinology. *J Mol Endocrinol* **40**(6), 253-61.
- Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., and Butler, P. C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**(1), 102-10.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O., and Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7), 2334-9.
- Caicedo, A. (2013). Paracrine and autocrine interactions in the human islet: more than meets the eye. *Semin Cell Dev Biol* **24**(1), 11-21.
- Callejas, D., Mann, C. J., Ayuso, E., Lage, R., Grifoll, I., Roca, C., Andaluz, A., Ruiz-de Gopegui, R., Montane, J., Munoz, S., Ferre, T., Haurigot, V., Zhou, S., Ruberte, J., Mingozzi, F., High, K. A., Garcia, F., and Bosch, F. (2013). Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes* **62**(5), 1718-29.
- Campbell, I. L., Hobbs, M. V., Dockter, J., Oldstone, M. B., and Allison, J. (1994). Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am J Pathol* **145**(1), 157-66.
- Carter, P. J., and Samulski, R. J. (2000). Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int J Mol Med* **6**(1), 17-27.
- Casellas, A., Salavert, A., Agudo, J., Ayuso, E., Jimenez, V., Moya, M., Munoz, S., Franckhauser, S., and Bosch, F. (2006). Expression of IGF-I in pancreatic islets prevents lymphocytic infiltration and protects mice from type 1 diabetes. *Diabetes* **55**(12), 3246-55.

Cnop, M., Hughes, S. J., Igoillo-Esteve, M., Hoppa, M. B., Sayyed, F., van de Laar, L., Gunter, J. H., de Koning, E. J., Walls, G. V., Gray, D. W., Johnson, P. R., Hansen, B. C., Morris, J. F., Pipeleers-Marichal, M., Cnop, I., and Clark, A. (2010). The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation. *Diabetologia* **53**(2), 321-30.

Crane, B., Luo, X., Demaster, A., Williams, K. D., Kozink, D. M., Zhang, P., Brown, T. T., Pinto, C. R., Oka, K., Sun, F., Jackson, M. W., Chan, L., and Koeberl, D. D. (2012). Rescue administration of a helper-dependent adenovirus vector with long-term efficacy in dogs with glycogen storage disease type Ia. *Gene Ther* **19**(4), 443-52.

Crivat, G., and Taraska, J. W. (2012). Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. *Trends Biotechnol* **30**(1), 8-16.

Cutrera, J., Dibra, D., Xia, X., Hasan, A., Reed, S., and Li, S. (2011). Discovery of a linear peptide for improving tumor targeting of gene products and treatment of distal tumors by IL-12 gene therapy. *Mol Ther* **19**(8), 1468-77.

Chaudhuri, T. R., Cao, Z., Krasnykh, V. N., Stargel, A. V., Belousova, N., Partridge, E. E., and Zinn, K. R. (2003). Blood-based screening and light based imaging for the early detection and monitoring of ovarian cancer xenografts. *Technol Cancer Res Treat* **2**(2), 171-80.

Chen, H. H., Mack, L. M., Kelly, R., Ontell, M., Kochanek, S., and Clemens, P. R. (1997). Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5), 1645-50.

Chen, S., Ding, J. H., Bekeredjian, R., Yang, B. Z., Shohet, R. V., Johnston, S. A., Hohmeier, H. E., Newgard, C. B., and Grayburn, P. A. (2006). Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22), 8469-74.

Chen, Z., Herman, A. E., Matos, M., Mathis, D., and Benoist, C. (2005). Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *J Exp Med* **202**(10), 1387-97.

Cheng, H., Wolfe, S. H., Valencia, V., Qian, K., Shen, L., Phillips, M. I., Chang, L. J., and Zhang, Y. C. (2007). Efficient and persistent transduction of exocrine and endocrine pancreas by adeno-associated virus type 8. *J Biomed Sci* **14**(5), 585-94.

Chirmule, N., Propert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R., and Wilson, J. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* **6**(9), 1574-83.

Chuang, J. C., Sakata, I., Kohno, D., Perello, M., Osborne-Lawrence, S., Repa, J. J., and Zigman, J. M. (2011). Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol Endocrinol* **25**(9), 1600-11.

- Danthinne, X., and Imperiale, M. J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* **7**(20), 1707-14.
- Deltour, L., Leduque, P., Blume, N., Madsen, O., Dubois, P., Jami, J., and Bucchini, D. (1993). Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(2), 527-31.
- DelloRusso, C., Scott, J. M., Hartigan-O'Connor, D., Salvatori, G., Barjot, C., Robinson, A. S., Crawford, R. W., Brooks, S. V., and Chamberlain, J. S. (2002). Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20), 12979-84.
- Deyle, D. R., and Russell, D. W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther* **11**(4), 442-7.
- Dimmock, D., Brunetti-Pierri, N., Palmer, D. J., Beaudet, A. L., and Ng, P. (2011). Correction of hyperbilirubinemia in gunn rats using clinically relevant low doses of helper-dependent adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **22**(4), 483-8.
- Dobie, K., Mehtali, M., McClenaghan, M., and Lathe, R. (1997). Variegated gene expression in mice. *Trends Genet* **13**(4), 127-30.
- Dolgin, E. (2012). Medical devices: Managed by machine. *Nature* **485**(7398), S6-8.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., and Melton, D. A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**(6987), 41-6.
- Eizirik, D. L., Pipeleers, D. G., Ling, Z., Welsh, N., Hellerstrom, C., and Andersson, A. (1994). Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20), 9253-6.
- Fan, Y., Rudert, W. A., Grupillo, M., He, J., Sisino, G., and Trucco, M. (2009). Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *EMBO J* **28**(18), 2812-24.
- Finegood, D. T., Scaglia, L., and Bonner-Weir, S. (1995). Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* **44**(3), 249-56.
- Freeman, M. L., DiSario, J. A., Nelson, D. B., Fennerty, M. B., Lee, J. G., Bjorkman, D. J., Overby, C. S., Aas, J., Ryan, M. E., Bochna, G. S., Shaw, M. J., Snady, H. W., Erickson, R. V., Moore, J. P., and Roel, J. P. (2001). Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective, multicenter study. *Gastrointest Endosc* **54**(4), 425-34.

- Furuya, F., Shimura, H., Asami, K., Ichijo, S., Takahashi, K., Kaneshige, M., Oikawa, Y., Aida, K., Endo, T., and Kobayashi, T. (2013). Ligand-bound thyroid hormone receptor contributes to reprogramming of pancreatic acinar cells into insulin-producing cells. *J Biol Chem* **288**(22), 16155-66.
- Garcia-Ocana, A., Takane, K. K., Syed, M. A., Philbrick, W. M., Vasavada, R. C., and Stewart, A. F. (2000). Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia. *J Biol Chem* **275**(2), 1226-32.
- Garcia-Ocana, A., Vasavada, R. C., Cebrian, A., Reddy, V., Takane, K. K., Lopez-Talavera, J. C., and Stewart, A. F. (2001). Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice. *Diabetes* **50**(12), 2752-62.
- Garrick, D., Fiering, S., Martin, D. I., and Whitelaw, E. (1998). Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet* **18**(1), 56-9.
- Gerard, X., Vignaud, L., Charles, S., Pinset, C., Scherman, D., Kichler, A., and Israeli, D. (2009). Real-time monitoring of cell transplantation in mouse dystrophic muscles by a secreted alkaline phosphatase reporter gene. *Gene Ther* **16**(6), 815-9.
- Giacca, M., and Zacchigna, S. (2012). Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Control Release* **161**(2), 377-88.
- Gotthardt, M. (2011). A therapeutic insight in beta-cell imaging? *Diabetes* **60**(2), 381-2.
- Granata, R., Settanni, F., Biancone, L., Trovato, L., Nano, R., Bertuzzi, F., Destefanis, S., Annunziata, M., Martinetti, M., Catapano, F., Ghe, C., Isgaard, J., Papotti, M., Ghigo, E., and Muccioli, G. (2007). Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology* **148**(2), 512-29.
- Granata, R., Volante, M., Settanni, F., Gauna, C., Ghe, C., Annunziata, M., Deidda, B., Gesmundo, I., Abribat, T., van der Lely, A. J., Muccioli, G., Ghigo, E., and Papotti, M. (2010). Unacylated ghrelin and obestatin increase islet cell mass and prevent diabetes in streptozotocin-treated newborn rats. *J Mol Endocrinol* **45**(1), 9-17.
- Graubert, T. A., Hug, B. A., Wesselschmidt, R., Hsieh, C. L., Ryan, T. M., Townes, T. M., and Ley, T. J. (1998). Stochastic, stage-specific mechanisms account for the variegation of a human globin transgene. *Nucleic Acids Res* **26**(12), 2849-58.
- Gray, S. J., Nagabhushan Kalburgi, S., McCown, T. J., and Jude Samulski, R. (2013). Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene Ther* **20**(4), 450-9.

- Grewal, I. S., Rutledge, B. J., Fiorillo, J. A., Gu, L., Gladue, R. P., Flavell, R. A., and Rollins, B. J. (1997). Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes: abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *J Immunol* **159**(1), 401-8.
- Guy, L. G., Kothary, R., and Wall, L. (1997). Position effects in mice carrying a lacZ transgene in cis with the beta-globin LCR can be explained by a graded model. *Nucleic Acids Res* **25**(21), 4400-7.
- Habener, J. F., Kemp, D. M., and Thomas, M. K. (2005). Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* **146**(3), 1025-34.
- Halban, P. A. (2004). Cellular sources of new pancreatic beta cells and therapeutic implications for regenerative medicine. *Nat Cell Biol* **6**(11), 1021-5.
- Hang, Y., and Stein, R. (2011). MafA and MafB activity in pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* **22**(9), 364-73.
- Hara, M., Wang, X., Kawamura, T., Bindokas, V. P., Dizon, R. F., Alcoser, S. Y., Magnuson, M. A., and Bell, G. I. (2003). Transgenic mice with green fluorescent protein-labeled pancreatic beta -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(1), E177-83.
- Harms, J. S., and Splitter, G. A. (1995). Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum Gene Ther* **6**(10), 1291-7.
- Harrison, L. C. (2001). Risk assessment, prediction and prevention of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* **2**(2), 71-82.
- Haumaitre, C., Lenoir, O., and Scharfmann, R. (2008). Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors. *Mol Cell Biol* **28**(20), 6373-83.
- Haurigot, V., Marco, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruzo, A., Villacampa, P., Ayuso, E., Anor, S., Andaluz, A., Pineda, M., Garcia-Fructuoso, G., Molas, M., Maggioni, L., Munoz, S., Motas, S., Ruberte, J., Mingozi, F., Pumarola, M., and Bosch, F. (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J Clin Invest*.
- Hebrok, M., Kim, S. K., and Melton, D. A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* **12**(11), 1705-13.
- Hirai, H., Tani, T., Katoku-Kikyo, N., Kellner, S., Karian, P., Firpo, M., and Kikyo, N. (2011). Radical acceleration of nuclear reprogramming by chromatin remodeling with the transactivation domain of MyoD. *Stem Cells* **29**(9), 1349-61.

- Hiramatsu, N., Kasai, A., Hayakawa, K., Yao, J., and Kitamura, M. (2006). Real-time detection and continuous monitoring of ER stress in vitro and in vivo by ES-TRAP: evidence for systemic, transient ER stress during endotoxemia. *Nucleic Acids Res* **34**(13), e93.
- Holmstrom, S. R., Deering, T., Swift, G. H., Poelwijk, F. J., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A., and MacDonald, R. J. (2011). LRH-1 and PTF1-L coregulate an exocrine pancreas-specific transcriptional network for digestive function. *Genes Dev* **25**(16), 1674-9.
- Hughes, T. S., Langer, S. J., Johnson, K. W., Chavez, R. A., Watkins, L. R., Milligan, E. D., and Leinwand, L. A. (2009). Intrathecal injection of naked plasmid DNA provides long-term expression of secreted proteins. *Mol Ther* **17**(1), 88-94.
- Inagaki, K., Piao, C., Kotchey, N. M., Wu, X., and Nakai, H. (2008). Frequency and spectrum of genomic integration of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vector in neonatal mouse liver. *J Virol* **82**(19), 9513-24.
- Ishikawa, T. O., and Herschman, H. R. (2011). Conditional bicistronic Cre reporter line expressing both firefly luciferase and beta-galactosidase. *Mol Imaging Biol* **13**(2), 284-92.
- Jahansouz, C., Kumer, S. C., Ellenbogen, M., and Brayman, K. L. (2011). Evolution of beta-Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus: Pancreas Transplantation. *Diabetes Technol Ther* **13**(3), 395-418.
- Jimenez, V., Ayuso, E., Mallol, C., Agudo, J., Casellas, A., Obach, M., Munoz, S., Salavert, A., and Bosch, F. (2011). In vivo genetic engineering of murine pancreatic beta cells mediated by single-stranded adeno-associated viral vectors of serotypes 6, 8 and 9. *Diabetologia* **54**(5), 1075-86.
- Jimenez, V., Munoz, S., Casana, E., Mallol, C., Elias, I., Jambrina, C., Ribera, A., Ferre, T., Franckhauser, S., and Bosch, F. (2013). In vivo AAV-mediated Genetic Engineering of White and Brown Adipose Tissue in Adult Mice. *Diabetes*.
- Joglekar, M. V., Joglekar, V. M., and Hardikar, A. A. (2009). Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr Patterns* **9**(2), 109-13.
- Jooss, K., Yang, Y., Fisher, K. J., and Wilson, J. M. (1998). Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* **72**(5), 4212-23.
- Jorgensen, M. C., Ahnfelt-Ronne, J., Hald, J., Madsen, O. D., Serup, P., and Hecksher-Sorensen, J. (2007). An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* **28**(6), 685-705.
- Jose, A., Sobrevals, L., Miguel Camacho-Sanchez, J., Huch, M., Andreu, N., Ayuso, E., Navarro, P., Alemany, R., and Fillat, C. (2013). Intraductal delivery of adenoviruses targets

pancreatic tumors in transgenic Ela-myc mice and orthotopic xenografts. *Oncotarget* **4**(1), 94-105.

Josserand, V., Texier-Nogues, I., Huber, P., Favrot, M. C., and Coll, J. L. (2007). Non-invasive in vivo optical imaging of the lacZ and luc gene expression in mice. *Gene Ther* **14**(22), 1587-93.

Kahn, S. E. (2001). Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(9), 4047-58.

Kaneto, H., Matsuoka, T. A., Kawashima, S., Yamamoto, K., Kato, K., Miyatsuka, T., Katakami, N., and Matsuhisa, M. (2009). Role of MafA in pancreatic beta-cells. *Adv Drug Deliv Rev* **61**(7-8), 489-96.

Kang, J. H., and Chung, J. K. (2008). Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression. *J Nucl Med* **49 Suppl 2**, 164S-79S.

Kay, M. A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* **12**(5), 316-28.

Kay, M. A., Glorioso, J. C., and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* **7**(1), 33-40.

Keenan, D. B., Cartaya, R., and Mastrototaro, J. J. (2010). The pathway to the closed-loop artificial pancreas: research and commercial perspectives. *Pediatr Endocrinol Rev* **7 Suppl 3**, 445-51.

Kim, S. K., and Melton, D. A. (1998). Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22), 13036-41.

Kojima, H., Fujimiya, M., Matsumura, K., Nakahara, T., Hara, M., and Chan, L. (2004). Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8), 2458-63.

Kojima, H., Fujimiya, M., Matsumura, K., Younan, P., Imaeda, H., Maeda, M., and Chan, L. (2003). NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* **9**(5), 596-603.

Konrad, R. J., Mikolaenko, I., Tolar, J. F., Liu, K., and Kudlow, J. E. (2001). The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem J* **356**(Pt 1), 31-41.

- Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K. I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6), 2211-5.
- Krakowski, M., Yeung, B., Abdelmalik, R., Good, A., Mocnik, L., Sosa-Pineda, B., St-Onge, L., Gruss, P., and Sarvetnick, N. (2000). IFN-gamma overexpression within the pancreas is not sufficient to rescue Pax4, Pax6, and Pdx-1 mutant mice from death. *Pancreas* **21**(4), 399-406.
- Kruse, F., Komro, C. T., Michnoff, C. H., and MacDonald, R. J. (1988). The cell-specific elastase I enhancer comprises two domains. *Mol Cell Biol* **8**(2), 893-902.
- Kruse, F., Rose, S. D., Swift, G. H., Hammer, R. E., and MacDonald, R. J. (1993). An endocrine-specific element is an integral component of an exocrine-specific pancreatic enhancer. *Genes Dev* **7**(5), 774-86.
- Kruse, F., Rose, S. D., Swift, G. H., Hammer, R. E., and MacDonald, R. J. (1995). Cooperation between elements of an organ-specific transcriptional enhancer in animals. *Mol Cell Biol* **15**(8), 4385-94.
- Kulkarni, R. N. (2004). The islet beta-cell. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(3), 365-71.
- Law, L. K., and Davidson, B. L. (2005). What does it take to bind CAR? *Mol Ther* **12**(4), 599-609.
- Lee, S. H., Hao, E., Savinov, A. Y., Geron, I., Strongin, A. Y., and Itkin-Ansari, P. (2009). Human beta-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunisolation device: implications for diabetes cell therapies. *Transplantation* **87**(7), 983-91.
- Lenoir, O., Flosseau, K., Ma, F. X., Blondeau, B., Mai, A., Bassel-Duby, R., Ravassard, P., Olson, E. N., Haumaitre, C., and Scharfmann, R. (2011). Specific control of pancreatic endocrine beta- and delta-cell mass by class IIa histone deacetylases HDAC4, HDAC5, and HDAC9. *Diabetes* **60**(11), 2861-71.
- Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S. Y., Bhagwat, A. S., Malani, N., Anguela, X. M., Sharma, R., Ivanciu, L., Murphy, S. L., Finn, J. D., Khazi, F. R., Zhou, S., Paschon, D. E., Rebar, E. J., Bushman, F. D., Gregory, P. D., Holmes, M. C., and High, K. A. (2011). In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* **475**(7355), 217-21.
- Liu, Q., and Muruve, D. A. (2003). Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther* **10**(11), 935-40.

- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4), 402-8.
- Lock, M., McGorray, S., Auricchio, A., Ayuso, E., Beecham, E. J., Blouin-Tavel, V., Bosch, F., Bose, M., Byrne, B. J., Caton, T., Chiorini, J. A., Chtarto, A., Clark, K. R., Conlon, T., Darmon, C., Doria, M., Douar, A., Flotte, T. R., Francis, J. D., Francois, A., Giacca, M., Korn, M. T., Korytov, I., Leon, X., Leuchs, B., Lux, G., Melas, C., Mizukami, H., Moullier, P., Muller, M., Ozawa, K., Philipsberg, T., Poulard, K., Raupp, C., Riviere, C., Roosendaal, S. D., Samulski, R. J., Soltys, S. M., Surosky, R., Tenenbaum, L., Thomas, D. L., van Montfort, B., Veres, G., Wright, J. F., Xu, Y., Zelenia, O., Zentilin, L., and Snyder, R. O. (2010). Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 Reference Standard Material. *Hum Gene Ther* **21**(10), 1273-85.
- Loiler, S. A., Tang, Q., Clarke, T., Campbell-Thompson, M. L., Chiodo, V., Hauswirth, W., Cruz, P., Perret-Gentil, M., Atkinson, M. A., Ramiya, V. K., and Flotte, T. R. (2005). Localized gene expression following administration of adeno-associated viral vectors via pancreatic ducts. *Mol Ther* **12**(3), 519-27.
- Lysy, P. A., Weir, G. C., and Bonner-Weir, S. (2012). Concise review: pancreas regeneration: recent advances and perspectives. *Stem Cells Transl Med* **1**(2), 150-9.
- Maehr, R., Chen, S., Snitow, M., Ludwig, T., Yagasaki, L., Goland, R., Leibel, R. L., and Melton, D. A. (2009). Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(37), 15768-73.
- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., and Tochino, Y. (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* **29**(1), 1-13.
- Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, V. R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J. J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Rustagi, P. K., Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J. F., Lessard, R. R., Sommer, J. M., Tigges, M., Sabatino, D., Luk, A., Jiang, H., Mingozzi, F., Couto, L., Ertl, H. C., High, K. A., and Kay, M. A. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**(3), 342-7.
- Mansouri, A. (2012). Development and regeneration in the endocrine pancreas. *ISRN Endocrinol* **2012**, 640956.
- Martin, M., Gallego-Llamas, J., Ribes, V., Keding, M., Niederreither, K., Chambon, P., Dolle, P., and Gradwohl, G. (2005). Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice. *Dev Biol* **284**(2), 399-411.
- Masat, E., Pavani, G., and Mingozzi, F. (2013). Humoral immunity to AAV vectors in gene therapy: challenges and potential solutions. *Discov Med* **15**(85), 379-89.

- McCaffrey, A. P., Fawcett, P., Nakai, H., McCaffrey, R. L., Ehrhardt, A., Pham, T. T., Pandey, K., Xu, H., Feuss, S., Storm, T. A., and Kay, M. A. (2008). The host response to adenovirus, helper-dependent adenovirus, and adeno-associated virus in mouse liver. *Mol Ther* **16**(5), 931-41.
- McClane, S. J., Hamilton, T. E., DeMatteo, R. P., Burke, C., and Raper, S. E. (1997). Effect of adenoviral early genes and the host immune system on in vivo pancreatic gene transfer in the mouse. *Pancreas* **15**(3), 236-45.
- Mehran, A. E., Templeman, N. M., Brigidi, G. S., Lim, G. E., Chu, K. Y., Hu, X., Botezelli, J. D., Asadi, A., Hoffman, B. G., Kieffer, T. J., Bamji, S. X., Clee, S. M., and Johnson, J. D. (2012). Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab* **16**(6), 723-37.
- Mehtali, M., LeMeur, M., and Lathe, R. (1990). The methylation-free status of a housekeeping transgene is lost at high copy number. *Gene* **91**(2), 179-84.
- Meier JJ, B. A., Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza RA, Butler PC. (2008). Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* **57**(6), 1584-1594.
- Meng, Y., Kasai, A., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Takeda, M., Shimizu, F., Kawachi, H., Yao, J., and Kitamura, M. (2005). Real-time monitoring of mesangial cell-macrophage cross-talk using SEAP in vitro and ex vivo. *Kidney Int* **68**(2), 886-93.
- Mingozzi, F., Chen, Y., Edmonson, S. C., Zhou, S., Thurlings, R. M., Tak, P. P., High, K. A., and Vervoordeldonk, M. J. (2013a). Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue. *Gene Ther* **20**(4), 417-24.
- Mingozzi, F., and High, K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* **12**(5), 341-55.
- Mingozzi, F., and High, K. A. (2013b). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**(1), 23-36.
- Mingozzi, F., Meulenberg, J. J., Hui, D. J., Basner-Tschakarjan, E., Hasbrouck, N. C., Edmonson, S. A., Hutnick, N. A., Betts, M. R., Kastelein, J. J., Stroes, E. S., and High, K. A. (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* **114**(10), 2077-86.
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* **127**(1), 126-32.

- Molotkov, A., Molotkova, N., and Duester, G. (2005). Retinoic acid generated by Raldh2 in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev Dyn* **232**(4), 950-7.
- Montanya, E., Nacher, V., Biarnes, M., and Soler, J. (2000). Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* **49**(8), 1341-6.
- Montoliu, L., Chavez, S., and Vidal, M. (2000). Variegation associated with lacZ in transgenic animals: a warning note. *Transgenic Res* **9**(3), 237-9.
- Muhammad, A. K., Puntel, M., Candolfi, M., Salem, A., Yagiz, K., Farrokhi, C., Kroeger, K. M., Xiong, W., Curtin, J. F., Liu, C., Lawrence, K., Bondale, N. S., Lerner, J., Baker, G. J., Foulad, D., Pechnick, R. N., Palmer, D., Ng, P., Lowenstein, P. R., and Castro, M. G. (2010). Study of the efficacy, biodistribution, and safety profile of therapeutic gutless adenovirus vectors as a prelude to a phase I clinical trial for glioblastoma. *Clin Pharmacol Ther* **88**(2), 204-13.
- Nakai, H., Yant, S. R., Storm, T. A., Fuess, S., Meuse, L., and Kay, M. A. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* **75**(15), 6969-76.
- Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D. C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A. J., Harrington, C., O'Beirne, J., Smith, K., Pasi, J., Glader, B., Rustagi, P., Ng, C. Y., Kay, M. A., Zhou, J., Spence, Y., Morton, C. L., Allay, J., Coleman, J., Sleep, S., Cunningham, J. M., Srivastava, D., Basner-Tschakarjan, E., Mingozzi, F., High, K. A., Gray, J. T., Reiss, U. M., Nienhuis, A. W., and Davidoff, A. M. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* **365**(25), 2357-65.
- Ohneda, K., Ee, H., and German, M. (2000). Regulation of insulin gene transcription. *Semin Cell Dev Biol* **11**(4), 227-33.
- Olbrot, M., Rud, J., Moss, L. G., and Sharma, A. (2002). Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10), 6737-42.
- Orci, L., and Unger, R. H. (1975). Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet* **2**(7947), 1243-4.
- Pagliuca, F. W., and Melton, D. A. (2013). How to make a functional beta-cell. *Development* **140**(12), 2472-83.
- Palmer, D., and Ng, P. (2003). Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Mol Ther* **8**(5), 846-52.

- Palmer, D. J., and Ng, P. (2005). Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* **16**(1), 1-16.
- Palmer, D. J., and Ng, P. (2008). Methods for the production of helper-dependent adenoviral vectors. *Methods Mol Biol* **433**, 33-53.
- Park, S. Y., and Bell, G. I. (2009). Noninvasive monitoring of changes in pancreatic beta-cell mass by bioluminescent imaging in MIP-luc transgenic mice. *Horm Metab Res* **41**(1), 1-4.
- Park, S. Y., Wang, X., Chen, Z., Powers, A. C., Magnuson, M. A., Head, W. S., Piston, D. W., and Bell, G. I. (2005). Optical imaging of pancreatic beta cells in living mice expressing a mouse insulin I promoter-firefly luciferase transgene. *Genesis* **43**(2), 80-6.
- Pelegrin, M., Devedjian, J. C., Costa, C., Visa, J., Solanes, G., Pujol, A., Asins, G., Valera, A., and Bosch, F. (1998). Evidence from transgenic mice that interferon-beta may be involved in the onset of diabetes mellitus. *J Biol Chem* **273**(20), 12332-40.
- Petersen, H. V., Serup, P., Leonard, J., Michelsen, B. K., and Madsen, O. D. (1994). Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22), 10465-9.
- Peyton, M., Moss, L. G., and Tsai, M. J. (1994). Two distinct class A helix-loop-helix transcription factors, E2A and BETA1, form separate DNA binding complexes on the insulin gene E box. *J Biol Chem* **269**(41), 25936-41.
- Picarella, D. E., Kratz, A., Li, C. B., Ruddle, N. H., and Flavell, R. A. (1993). Transgenic tumor necrosis factor (TNF)-alpha production in pancreatic islets leads to insulinitis, not diabetes. Distinct patterns of inflammation in TNF-alpha and TNF-beta transgenic mice. *J Immunol* **150**(9), 4136-50.
- Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B., and Sussel, L. (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9), 2924-9.
- Printz, R. L., Magnuson, M. A., and Granner, D. K. (1993). Mammalian glucokinase. *Annu Rev Nutr* **13**, 463-96.
- Puri, S., and Hebrok, M. (2010). Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev Cell* **18**(3), 342-56.
- Qader, S. S., Hakanson, R., Rehfeld, J. F., Lundquist, I., and Salehi, A. (2008). Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul Pept* **146**(1-3), 230-7.

- Qader, S. S., Lundquist, I., Ekelund, M., Hakanson, R., and Salehi, A. (2005). Ghrelin activates neuronal constitutive nitric oxide synthase in pancreatic islet cells while inhibiting insulin release and stimulating glucagon release. *Regul Pept* **128**(1), 51-6.
- Qiu, J., and Pintel, D. J. (2004). Alternative polyadenylation of adeno-associated virus type 5 RNA within an internal intron is governed by the distance between the promoter and the intron and is inhibited by U1 small nuclear RNP binding to the intervening donor. *J Biol Chem* **279**(15), 14889-98.
- Rabinowitz, J. E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R. J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* **76**(2), 791-801.
- Rahier, J., Wallon, J., and Henquin, J. C. (1981). Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia* **20**(5), 540-6.
- Raper, S. E., and DeMatteo, R. P. (1996). Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat pancreas. *Pancreas* **12**(4), 401-10.
- Rawle, F. E., Shi, C. X., Brown, B., McKinven, A., Tinlin, S., Graham, F. L., Hough, C., and Lillcrap, D. (2004). Heterogeneity of the immune response to adenovirus-mediated factor VIII gene therapy in different inbred hemophilic mouse strains. *J Gene Med* **6**(12), 1358-68.
- Rhodes, C. J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* **307**(5708), 380-4.
- Robertson, G., Garrick, D., Wilson, M., Martin, D. I., and Whitelaw, E. (1996). Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse. *Nucleic Acids Res* **24**(8), 1465-71.
- Rossini, A. A., Appel, M. C., Williams, R. M., and Like, A. A. (1977). Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes* **26**(10), 916-20.
- Rukstalis, J. M., and Habener, J. F. (2009). Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets* **1**(3), 177-84.
- Russell, W. C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* **90**(Pt 1), 1-20.
- Ruzo, A., Marco, S., Garcia, M., Villacampa, P., Ribera, A., Ayuso, E., Maggioni, L., Mingozzi, F., Haurigot, V., and Bosch, F. (2012). Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Hum Gene Ther* **23**(12), 1237-46.

Samaranch, L., Salegio, E. A., San Sebastian, W., Kells, A. P., Bringas, J. R., Forsayeth, J., and Bankiewicz, K. S. (2013). Strong cortical and spinal cord transduction after AAV7 and AAV9 delivery into the cerebrospinal fluid of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* **24**(5), 526-32.

Samulski, R. J., Berns, K. I., Tan, M., and Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(6), 2077-81.

Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., and Hunter, L. A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* **10**(12), 3941-50.

Sander, M., Neubuser, A., Kalamaras, J., Ee, H. C., Martin, G. R., and German, M. S. (1997). Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* **11**(13), 1662-73.

Sarvetnick, N., Shizuru, J., Liggitt, D., Martin, L., McIntyre, B., Gregory, A., Parslow, T., and Stewart, T. (1990). Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature* **346**(6287), 844-7.

Schmid, R. M., Weidenbach, H., Yamagushi, H., Luhrs, H., Liptay, S., and Adler, G. (1998). Direct gene transfer into the rat pancreas using DNA-liposomes. *Eur J Clin Invest* **28**(3), 220-6.

Schnedl, W. J., Ferber, S., Johnson, J. H., and Newgard, C. B. (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* **43**(11), 1326-33.

Seymour, P. A., Freude, K. K., Dubois, C. L., Shih, H. P., Patel, N. A., and Sander, M. (2008). A dosage-dependent requirement for Sox9 in pancreatic endocrine cell formation. *Dev Biol* **323**(1), 19-30.

Seymour, P. A., Freude, K. K., Tran, M. N., Mayes, E. E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G., and Sander, M. (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6), 1865-70.

Sherry, N., Hagopian, W., Ludvigsson, J., Jain, S. M., Wahlen, J., Ferry, R. J., Jr., Bode, B., Aronoff, S., Holland, C., Carlin, D., King, K. L., Wilder, R. L., Pillemer, S., Bonvini, E., Johnson, S., Stein, K. E., Koenig, S., Herold, K. C., and Daifotis, A. G. (2011). Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protege study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **378**(9790), 487-97.

Shi, Y., Desponts, C., Do, J. T., Hahm, H. S., Scholer, H. R., and Ding, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* **3**(5), 568-74.

Shih, H. P., Kopp, J. L., Sandhu, M., Dubois, C. L., Seymour, P. A., Grapin-Botton, A., and Sander, M. (2012). A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation. *Development* **139**(14), 2488-99.

Shih, H. P., Wang, A., and Sander, M. (2013). Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

Shimajiri, Y., Kosaka, Y., Scheel, D. W., Lynn, F. C., Kishimoto, N., Wang, J., Zhao, S., and German, M. S. (2011). A mouse model for monitoring islet cell genesis and developing therapies for diabetes. *Dis Model Mech* **4**(2), 268-76.

Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-39.

Shiraiwa, T., Kaneto, H., Miyatsuka, T., Kato, K., Yamamoto, K., Kawashima, A., Kajimoto, Y., Matsuoka, T. A., Matsuhisa, M., Yamasaki, Y., and Fujitani, Y. (2007). Establishment of a non-invasive mouse reporter model for monitoring in vivo pdx-1 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* **361**(3), 739-44.

Singhal, N., Graumann, J., Wu, G., Arauzo-Bravo, M. J., Han, D. W., Greber, B., Gentile, L., Mann, M., and Scholer, H. R. (2010). Chromatin-Remodeling Components of the BAF Complex Facilitate Reprogramming. *Cell* **141**(6), 943-55.

Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J. A., and Martin, F. (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **49**(2), 157-62.

Srivastava, A., Lusby, E. W., and Berns, K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* **45**(2), 555-64.

Stefan, Y., Grasso, S., Perrelet, A., and Orci, L. (1982). The pancreatic polypeptide-rich lobe of the human pancreas: definitive identification of its derivation from the ventral pancreatic primordium. *Diabetologia* **23**(2), 141-2.

Sutherland, H. G., Martin, D. I., and Whitelaw, E. (1997). A globin enhancer acts by increasing the proportion of erythrocytes expressing a linked transgene. *Mol Cell Biol* **17**(3), 1607-14.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* **50**(6), 537-46.

Taniguchi, H., Yamato, E., Tashiro, F., Ikegami, H., Ogihara, T., and Miyazaki, J. (2003). beta-cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas. *Gene Ther* **10**(1), 15-23.

- Tannous, B. A., and Teng, J. (2011). Secreted blood reporters: insights and applications. *Biotechnol Adv* **29**(6), 997-1003.
- Teta, M., Long, S. Y., Wartschow, L. M., Rankin, M. M., and Kushner, J. A. (2005). Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* **54**(9), 2557-67.
- Thatava, T., Kudva, Y. C., Edukulla, R., Squillace, K., De Lamo, J. G., Khan, Y. K., Sakuma, T., Ohmine, S., Terzic, A., and Ikeda, Y. (2013). Inpatient variations in type 1 diabetes-specific iPS cell differentiation into insulin-producing cells. *Mol Ther* **21**(1), 228-39.
- Thompson, N., Gesina, E., Scheinert, P., Bucher, P., and Grapin-Botton, A. (2012). RNA profiling and chromatin immunoprecipitation-sequencing reveal that PTF1a stabilizes pancreas progenitor identity via the control of MNX1/HLXB9 and a network of other transcription factors. *Mol Cell Biol* **32**(6), 1189-99.
- Thorens, B. (2013). The required beta cell research for improving treatment of type 2 diabetes. *J Intern Med* **274**(3), 203-14.
- Toietta, G., Koehler, D. R., Finegold, M. J., Lee, B., Hu, J., and Beaudet, A. L. (2003). Reduced inflammation and improved airway expression using helper-dependent adenoviral vectors with a K18 promoter. *Mol Ther* **7**(5 Pt 1), 649-58.
- Tong, J., Prigeon, R. L., Davis, H. W., Bidlingmaier, M., Kahn, S. E., Cummings, D. E., Tschop, M. H., and D'Alessio, D. (2010). Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* **59**(9), 2145-51.
- Tripathy, S. K., Black, H. B., Goldwasser, E., and Leiden, J. M. (1996). Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* **2**(5), 545-50.
- Tung, C. H., Zeng, Q., Shah, K., Kim, D. E., Schellingerhout, D., and Weissleder, R. (2004). In vivo imaging of beta-galactosidase activity using far red fluorescent switch. *Cancer Res* **64**(5), 1579-83.
- van Belle, T. L., Coppieters, K. T., and von Herrath, M. G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* **91**(1), 79-118.
- Verma, I. M., and Weitzman, M. D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* **74**, 711-38.
- Volpers, C., and Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S164-71.

- Wakae-Takada, N., Xuan, S., Watanabe, K., Meda, P., and Leibel, R. L. (2013). Molecular basis for the regulation of islet beta cell mass in mice: the role of E-cadherin. *Diabetologia* **56**(4), 856-66.
- Waldron-Lynch, F., and Herold, K. C. (2011). Immunomodulatory therapy to preserve pancreatic beta-cell function in type 1 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* **10**(6), 439-52.
- Wang, A. Y., Ehrhardt, A., Xu, H., and Kay, M. A. (2007). Adenovirus transduction is required for the correction of diabetes using Pdx-1 or Neurogenin-3 in the liver. *Mol Ther* **15**(2), 255-63.
- Wang, A. Y., Peng, P. D., Ehrhardt, A., Storm, T. A., and Kay, M. A. (2004). Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther* **15**(4), 405-13.
- Wang, M., Orsini, C., Casanova, D., Millan, J. L., Mahfoudi, A., and Thuillier, V. (2001). MUSEAP, a novel reporter gene for the study of long-term gene expression in immunocompetent mice. *Gene* **279**(1), 99-108.
- Wang, Q., and Finer, M. H. (1996). Second-generation adenovirus vectors. *Nat Med* **2**(6), 714-6.
- Wang, Z., Ma, H. I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., and Xiao, X. (2003). Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* **10**(26), 2105-11.
- Weaver, E. A., Nehete, P. N., Buchl, S. S., Senac, J. S., Palmer, D., Ng, P., Sastry, K. J., and Barry, M. A. (2009). Comparison of replication-competent, first generation, and helper-dependent adenoviral vaccines. *PLoS One* **4**(3), e5059.
- Weitzman, M. D., Kyostio, S. R., Kotin, R. M., and Owens, R. A. (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13), 5808-12.
- Wentworth, B. M., Schaefer, I. M., Villa-Komaroff, L., and Chirgwin, J. M. (1986). Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J Mol Evol* **23**(4), 305-12.
- Whitelaw, E., Sutherland, H., Kearns, M., Morgan, H., Weaving, L., and Garrick, D. (2001). Epigenetic effects on transgene expression. *Methods Mol Biol* **158**, 351-68.
- Wilson, G. L., Patton, N. J., McCord, J. M., Mullins, D. W., and Mossman, B. T. (1984). Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia* **27**(6), 587-91.

- Wilson, M. E., Scheel, D., and German, M. S. (2003). Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev* **120**(1), 65-80.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R. J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* **72**(3), 2224-32.
- Xie, R., Everett, L. J., Lim, H. W., Patel, N. A., Schug, J., Kroon, E., Kelly, O. G., Wang, A., D'Amour, K. A., Robins, A. J., Won, K. J., Kaestner, K. H., and Sander, M. (2013). Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **12**(2), 224-37.
- Yada, T., Dezaki, K., Sone, H., Koizumi, M., Damdindorj, B., Nakata, M., and Kakei, M. (2008). Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev* **4**(1), 18-23.
- Yang, L., Ji, W., Xue, Y., and Chen, L. (2013). Imaging beta-cell mass and function in situ and in vivo. *J Mol Med (Berl)* **91**(8), 929-38.
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gonczol, E., and Wilson, J. M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10), 4407-11.
- Yeboor, V., Liu, V., Espiritu, C., Paul, A., Oka, K., Kojima, H., and Chan, L. (2009). Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes. *Dev Cell* **16**(3), 358-73.
- Zaldumbide, A., Carlotti, F., Goncalves, M. A., Knaan-Shanzer, S., Cramer, S. J., Roep, B. O., Wiertz, E. J., and Hoeben, R. C. (2012). Adenoviral vectors stimulate glucagon transcription in human mesenchymal stem cells expressing pancreatic transcription factors. *PLoS One* **7**(10), e48093.
- Zanta-Boussif, M. A., Charrier, S., Brice-Ouzet, A., Martin, S., Opolon, P., Thrasher, A. J., Hope, T. J., and Galy, A. (2009). Validation of a mutated PRE sequence allowing high and sustained transgene expression while abrogating WHV-X protein synthesis: application to the gene therapy of WAS. *Gene Ther* **16**(5), 605-19.
- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., Shi, Y., and Deng, H. (2009a). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* **19**(4), 429-38.
- Zhang, G. J., Chen, T. B., Connolly, B., Lin, S. A., Hargreaves, R., Vanko, A., Bednar, B., Macneil, D. J., Sur, C., and Williams, D. L. (2009b). In vivo optical imaging of LacZ expression using lacZ transgenic mice. *Assay Drug Dev Technol* **7**(4), 391-9.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D. A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* **455**(7213), 627-32.

Zhou, Q., Law, A. C., Rajagopal, J., Anderson, W. J., Gray, P. A., and Melton, D. A. (2007). A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* **13**(1), 103-14.

Zhou, Z., and Jensen, P. E. (2013). Structural Characteristics of HLA-DQ that May Impact DM Editing and Susceptibility to Type-1 Diabetes. *Front Immunol* **4**, 262.

Ziv, O., Glaser, B., and Dor, Y. (2013). The plastic pancreas. *Dev Cell* **26**(1), 3-7.