



Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la
FACULTAT DE VETERINÀRIA**

**CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL
I TERÀPIA GÈNICA (CBATEG)**

**CONTRARESTACIÓ DE LA DIABETIS MELLITUS
MITJANÇANT LA GENERACIÓ D'UN SENSOR DE LA
GLUCOSA A MÚSCUL ESQUELÈTIC**

JOEL MONTANÉ MOGAS

Memòria presentada pel llicenciat JOEL MONTANÉ i MOGAS per optar al grau de Doctor en Bioquímica.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària i al Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

JOEL MONTANÉ i MOGAS

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

Octubre de 2006

BARCELONA

A tots els diabètics...

AGRAÏMENTS

Aquesta és la part que em resulta més fàcil d'escriure. I no només perquè no haig de llegir cap article, sinó perquè bàsicament, ja sé el que haig de dir. Al llarg d'una tesi doctoral són molts els deutes i les gratituds que acabes acumulant. Per tant, en aquest apartat tant "literari" i per endavant, m'agradaria donar d'una manera realment sincera, les GRÀCIES a tota aquella gent que en algun moment o altre ha estat amb mi i m'ha ajudat durant aquesta etapa de la meua vida.

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies a la meua directora de tesi, la Dra. Fàtima Bosch per l'esforç i la dedicació i l'energia que t'ha suposat la supervisió d'aquest treball.

Mai m'oblidaria d'agrair infinitament el meu mentor, l'Alex Mas. Amb ell vaig començar aquesta tesi i sempre hi és present d'una manera o d'altra. N' he après molt de tu, sobretot una cançó molt especial i que m'emociono quan la tataratejo. A la meua mà dreta, el Xavi Angula, que hem compartit tants moments que t'hauria de dedicar un capítol sencer, i això aquí, no crec que em deixin. Ja saps que has sigut un pilar força important. A la meua *catalina* preferida, que s'encarrega de fer-me'l més proper, bastant sovint. La Virginia, després de tantes experiències compartides ja deu saber que el meu agraïment serà per sempre.

En aquesta recta final no em puc deixar en Chris Mann, un home una mica estrany que ve de Perth. Sembla el mercat de la boqueria perquè sempre troba coses estranyes i impossibles de trobar. Ell és l'autèntic model del científic que vull ser de gran. I també agraeixo al científic que NO vull ser de gran!, el Sr. Callejas...aquest no és australià, sinó del Masnou. Calle, ets un mestre de mestres. Algun dia tindràs un laboratori i espero que em contractis. A en Carles Roca, sempre disposat amb la seva insaciable ajuda i el seu insaciable humor. No és un empanat, sinó excel·lent en tots els sentits.

Amb la Maria Ontiveros també he compartit molts moments, molts d'ells força interessants i novedosos, també dignes de ser publicats. Estic segur que això seguirà així...però sempre i quant paguis tu el cafè! Parlant de maries, la Maria Molas. Gràcies pels virus. A l'Edu, company d'ordinador i de moltes altres coses. Gràcies per estar sempre al meu costat i ajudar-me en tot. Aprofito per incloure a la Sabrina. La teua presència i rialles ens animen a tot el laboratori. Vull agrair a la Marta tota la teua ajuda. Per les immunitats d'última hora i per les que no. I a la Mireia per haver-me fet amenes les estades tant a l'estabulari com fora d'ell. A la Sylvie i a la Tura, per estar molts cops a la meua disposició i per tots els moments compartits en aquests anys.

Uns caminadors que d'aquí a poc no tindran cap repte a la seva alçada. Ari, gràcies per la teua ajuda, consells, energia matineria i companyia. I a l'Antonio per haver-me acompanyat en aquest camí des del

principi i per totes les discussions transcendents de la vida del becari. Al Sergio, que l'únic defecte que té és deure'm un cafè. Tot lo altre és mereix la meua admiració. Gràcies per cuidar-me sempre i intentar no fer-me mal. Molta sort! I a la Judith, per la seva ajuda i per posar-me al dia de la vida social del laboratori i en general. A més, com la tinc davant de l'ordinador és a la persona a qui més veig de tot el laboratori. A l'Alba per ser la meua mare adoptiva. Per defensar-me dels dolents, per compartir amb mi tots els teus coneixements. I als seus dos grans homenets.

A la parella més musculada del laboratori. Merci Miquel per tots els consells i la teua saviesa. I a l'Albert per estar sempre de bon humor i no cansar-se mai d'avisar-me quan van a esmorzar. A la Vero la riojana per ajudar-me amb tot el marrón dels virus. Espero no haver-te donat gaire feina. Gràcies a la Ivet per compartir certs moments incòmodes...Sabadell malapell!. A l'Armeni més divertit que conec de tots els que conec, en Gor, sempre disposat a ensenyar-te alguna cosa nova. Aprofito per incloure l'equip d'ulls: a l'Albert i la Pi, que mica en mica fan que el món de la retinopatia em sigui més familiar. Al Dr. Malcolm Watford, per les seves inefables converses. A les millors tècniques del laboratori, la Jennifer i la Lidia per tot el vostre ajut, tant important per la realització d'aquest treball. I al Carles Ros, a qui li desitjo molta sort al seu futur.

L'equip del SER-CBATEG, liderats pel comandant Pedro Otaegui han sigut part fonamental en la realització d'aquest treball. Moltes gràcies per cuidar-me els ratolins i pel vostre ajut. A l'equip de transgènics, l'Anna Arboç, l'Anna Pujol i l'Ainara per totes les trobades i companyia aquests anys.

A la gent de la quarta planta. La Clara en especial per totes les fotos del confocal i la seva ajuda i amistat. I a l'Anna Serafin per les precioses immunos que han tret tant de suc. A l'Ester, a la Glòria, a l'Andrés, al Ruberte, la Vero i la Cristina. I a la gent de la cinquena planta en general, al Raül per ser puntual com un rellotge i especialment, a l'Assumpció, i al Miquel Chillón per haver compartit uns inicis i haver estat amb mi sempre que et necessitava i més encara.

Aquest treball ha estat en part fet al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària. Agraïxo al Dr. Joaquim Ariño i a la Dra. Anna Bassols el seu tracte i amabilitat. A en Néstor Gómez, amb qui he compartit tantes converses polítiques que ja no sé ni què soc. A tots els Ariños i Bassoles per les creuades al passadís, per les ajudes d'última hora i per haver compartit amb mi tot aquest temps. Ivan, Ernesto, Raquel, Amparo, Laia, Laia Miquel, M^oJose, Dani, Asier, Maria, Fati. A l'Anna Vilalta per la seva gran ajuda, xerrades i consells.

Em trec el barret amb la Lourdes que ha sigut tant especial per mi que em poso vermell només de pensar-hi!. Per tots els moments compartits, que han sigut molts i per totes les converses. Pels miserables, pel réquiem, pels cafès, per Sevilla...

D'aquí a no res se'n va una persona molt especial que s'endurà part del meu cor, la Cle. Amb ella hi comparteixo moltíssims records i una gran amistat. Ja la trobo a faltar. Ja ens havíem acostumat a tu, i com no vas avisar que marxaves, em sembla que ens hem acostumat massa... I no només amb ella sinó a la seva família i l'Alfonso. Què hem de fer sense vosaltres?. Merci Cle.

Gràcies també a tota la gent de l'Hospital Clínic Veterinari. Al Fèlix i l'Anna per totes les cirurgies, a l'Ivonne i al Rafa pels seus consells i interès, a la Sònia Añor i Jaume Martorell pels electros viscuts, i sobretot a la gent de la UCI que han compartit, a vegades inesperadament, molts moments amb nosaltres. Gràcies Elsa, Mireia i Marian per la vostra paciència i a tota la resta de becaris pel vostre ajut.

A la Dra. Katherine High, la qual em va acollir altruïstament al seu laboratori al Children's Hospital de Philadelphia i al Federico Mingozzi per la seva gran ajuda, per la realització dels virus i per la seva amistat. Al Jeff, l'Alexander, el Mario, la Megan i la resta d'integrants d'aquest gran laboratori.

Quan fas el doctorat, et trobes que en aquest món no estàs sol. Trobes a molta gent que comparteix aquest llarg camí en d'altres llocs i que acaben sent en poques paraules: uns grans amics. Vull agrair, tot i que ja ho faig sovint, a l'Oriol Vidal. Amb ell he compartit innumerables quizos, alegries, crisis, sopars, moments de solitud, etc. que fan que ja el consideri part de mi. La vida a la Facultat és més dura sense tu! A la Montse per les seves històries, sempre tant interessants. I al a Mar per ajudar-me a desconectar, per la seva amistat i complicitat. En Josep, que fa temps vem començar la carrera junts i ara s'ha transformat en company indispensable. Per tot el que he après amb tu i tot el que hem passat junts, sobretot la Matagalls-Montserrat. I a una Vilafranquina molt especial, l'Ari, companya de viatges i d'aventures, amb ella, motxilla al canto, i fins a la fi de món! I un químic ben sonat, l'Oriol Roda, que no sap dir la paraula *no* i que m'acompanya als cims més alts. Al Ganxó amb ànsies de ser Cerdanyolenc, en Xavi León. Quines voltes que dona el món, oi? A la Sonieta, per ser tant maca.

També vull expressar uns agraïments a la gent que s'ha interessat pel meu treball al llarg d'aquest temps i que no saben lo important que és haver d'escoltar o (d'aguantar) dissertacions sobre ratolins, gossos i insulines. Especialment a l'Ester Cañadell i família, per una amistat i ajuda incondicionals. A l'Ada, pel seu interès, en majúscules. Per la seva alegria i energia, i per estar sempre amb mi. Al Quim, que tot i ser arqueòleg podem trobar projectes comuns. Al Jaume Cela, director meu en molts sentits, al Pastís, que no sap prou bé lo feliç que et fa quan et regala un mousse, a en Biel, a l'humanista proHabermars, tot i que Rawls és millor. A l'Oriol Rovira un gran amic culinquet amb qui difícilment et pots avorrir, a la Gemma, l'altre culinquet que ens portem pel mal camí mútuament. Al Carlos i al Jordi que mai m'han dit que no a res. Cada cap de setmana és un repte amb vosaltres. A l'Èlia, per compartir el meu humor de

manera totalment incondicional. A la Montse per enfangar-se amb mi com una marranota. A la Ivet, que de sortir del no res m'ha calat amb molta força.

I a la meva estimada família. Al meu pare i a la meva mare. Al meu germà especialment. Amb el seu interès han acabat sabent més sobre la diabetis que jo. Sense ells, està clar que res d'això hagués sigut igual. A la meva àvia, padrina, als meus tiets i cosinets, a la Rosa. El vostre interès ha fet fer-me viure molt més la meva feina i ha sigut energia per tirar endavant tots aquests anys. Gràcies a tots.

Un dia vaig anar a comprar el diari i la meva vida va canviar de cop. Qui ho diria? A partir d'aquell moment, vaig començar un camí nou al costat de la Núria. En els bons moments i en els no tant bons, amb tu he tirat endavant i així ho seguim fent. Per tota la comunicació, la complicitat i la confiança de tots aquests anys, aquesta tesi també és teva.

Aquest treball no hauria estat possible sense la Beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia, i la Beca para Estancias Breves del Ministerio de Educación y Ciencia. Les ajudes econòmiques nacionals del Instituto de Salud Carlos III (FIS01/0427, Red Grupos Diabetes Mellitus G03/212, Red Centros Metabolismo y Nutrición C03/08, REDEMETH G03/054 y FIS PI061417), el Plan Nacional I+D+I (SAF2002-20389 y SAF2005-01262), La Fundació Marató de TV3 (992710), i les ajudes de la Generalitat de Catalunya al Grups de Recerca Consolidats (2001SGR00195 y 2005SGR00673); i internacionals , FP5 EuroDiabetesGene (QLG1-CT-1999-00674), Network of Excellence EUGENE2 (LSHM-CT-2004-512013), BetaCellTherapy (FP6-2004-512145), Network of Excellence CLINIGENE (FP6-2004-LIFESCIHEALTH-5 (No 018933)).

TAULA D'ABREVIATURES

AAT	alfa-1 antitripsina
AAV	Vectors Adenoassociats
AAV1	Virus adenoassociat de serotip 1
AAV1-GFP	Virus AAV1 que contenen el gen de la GFP
AAV1-GK	Virus AAV1 que contenen el gen de la GK
AAV1-Ins	Virus AAV1 que contenen el gen de la Ins
AAV1-Ins+Gk	Solució que conté els virus AAV1-Ins i AAV1-GK.
Ad	Adenovirus
ADA	adenosina deaminasa
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
CFTR	Regulador de la conductància transmembrana de la fibrosi quística
CMV	Citomegalovirus
CMV-GFP	Gen de la GFP sota el control del promotor constitutiu del citomegalovirus
CMV-GK	Gen de la GK sota el control del promotor constitutiu del citomegalovirus
CMV-Ins	Gen de la Ins sota el control del promotor constitutiu del citomegalovirus
Con	Control
CSF	Factors estimuladors de colònia
CTLA4	Proteïna associada als limfòcits T citotòxics número 4
dATP	Desoxiadenosina-5'-trifosfat
dCTP	Desoxicitosina-5'-trifosfat
DEPC	Dietilpirocarbonat
dGTP	Desoxiguanina-5'-trifosfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dTTP	Desoxitimidina-5'-trifosfat
EDTA	Etilendiaminotetraacetat.
FBS	Sèrum fetal boví
GAD	Àcid glutàmic decarboxilasa
GFP	Proteïna verda fluorescent

GK	Glucocuinasa
GLUT	Transportador de glucosa
GS	Glucogen sintasa
HEK	Línia cel·lular derivada de ronyó embrionari humà
HK	Hexocuinasa
HLA	Regió d'antígens leucocitaris humans
HPLC	Cromatografia de líquids d'alta pressió
IDDM	Diabetes mellitus dependent d'insulina
IFN	Interferó
IGFBP	Proteïna d'unió al factor de creixement similar a la insulina
IL	Interleuquina
Ins	Insulina
ITR	Repeticions terminals invertides
IU	Unitats d'insulina
Km	Constant d'afinitat
LB	Luria Broth
LPK	Piruvat quinasa hepàtica
MHC	Complex major d'histocompatibilitat
MLC	Promotor de la cadena lleugera de la miosina
NOD	Diabètic no obès
ORF	Marc obert de lectura
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvat carboxiquinasa
RIA	Radioimmunoassaig
RNA	Àcid ribonucleic
RT-PCR	Retrotranscripció de la reacció en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecyl sulfat sòdic
SEM	Error estàndard de la mitja
SOCS	Supressor de vies de citoquines
Stz	Streptozotocina
Stz-Con	Ratolins control diabètics

Stz-Ins+GK	Ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK
TAE	Tampó Tris-acetat-EDTA
TGF-β	Factor de creixement transformant β
Th	Limfòcits T col·laborador (helper)
TNF	Factor de necrosis tumoral
UV	Ultraviolat
vg	Genomes virals

II INTRODUCCIÓ	3
1. Control de l'homeòstasi de la glucosa	3
1.1. <i>Paper del múscul esquelètic en l'homeòstasi de la glucosa</i>	4
1.2. <i>Estructura del múscul esquelètic</i>	7
2. La diabetis mellitus de tipus 1	9
2.1. <i>Introducció</i>	9
2.2. <i>Factors implicats en el desenvolupament de la diabetis mellitus de tipus 1</i>	11
2.2.1. <i>Factors genètics</i>	11
2.2.2. <i>Factors ambientals</i>	13
2.3. <i>Orígens de la diabetis mellitus de tipus 1</i>	15
2.3.1. <i>Resposta cel·lular</i>	15
2.3.2. <i>Resposta humoral</i>	16
2.3.2.1. <i>Paper de les citoquines</i>	16
2.3.2.2. <i>Paper dels autoantígens</i>	17
3. Tractament actual de la diabetis mellitus de tipus 1	18
3.1. <i>Teràpia substitutòria amb insulina</i>	18
3.2. <i>Transplantament de pàncrees</i>	21
3.3. <i>Transplantament d'illots pancreàtics</i>	22
4. Teràpia gènica	24
4.1. <i>Introducció a la teràpia gènica</i>	24
4.2. <i>Vectors virals recombinants</i>	25
4.2.1. <i>Vectors Adenoassociats recombinants</i>	28
4.2.1.1. <i>Característiques generals del genoma viral</i>	28
4.2.1.2. <i>Característiques dels vectors AAV recombinants</i>	29
4.2.1.3. <i>Transducció per part d'AAV de diferents tipus cel·lulars</i>	29
4.2.1.4. <i>Producció de vectors AAV</i>	30
4.2.1.5. <i>Assajos clínics en humans amb vectors AAV</i>	31

5. <u>Estratègies de teràpia gènica per a la diabetis mellitus.</u>	33
5.1. <u>Desenvolupament de mecanismes de prevenció de la destrucció autoimmune de les cèl·lules β o inducció de tolerància.</u>	33
5.2. <u>Estratègies de teràpia gènica centrades en la manipulació del pàncrees endocrí i/o illots pancreàtics aïllats.</u>	34
5.3. <u>Producció d'insulina per teixits extrapancreàtics.</u>	35
5.3.1. <u>Producció regulada d'insulina.</u>	36
5.3.2. <u>Producció constitutiva d'insulina conjuntament amb teràpia substitutòria.</u>	38
5.3.3. <u>Increment de la captació de glucosa per les cèl·lules extrapancreàtiques.</u>	40
5.3.4. <u>Increment en la captació de glucosa i de la producció d'insulina pel múscul esquelètic.</u>	42
III OBJECTIUS	44
IV RESULTATS	45
1. <u>Aproximacions a llarg termini de teràpia gènica per a la diabetis mellitus: utilització de vectors adenoassociats.</u>	45
1.1. <u>Transferència d'AAV1-GFP a múscul esquelètic de ratolí.</u>	45
1.2. <u>Determinació d'efectes secundaris al múscul i al fetge degut a l'administració d'AAV1 a múscul esquelètic.</u>	47
2. <u>Efecte de l'expressió d'insulina a múscul esquelètic de ratolins diabètics.</u>	49
2.1. <u>Anàlisi de la glucèmia d'animals tractats amb Stz.</u>	50
2.2. <u>Determinació dels nivells d'insulina en sèrum.</u>	51
2.3. <u>Expressió d'insulina a múscul esquelètic.</u>	53
2.4. <u>Evolució del consum de menjar i d'aigua.</u>	56

2.5.	<u>Efecte de l'expressió d'insulina sobre la massa muscular.....</u>	57
2.6.	<u>Test de tolerància a la insulina.....</u>	58
3.	<u>Efecte de l'expressió conjunta d'insulina i de glucoquinasa a llarg termini en animals diabètics.....</u>	61
3.1.	<u>Anàlisi de la glucèmia dels animals diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK.....</u>	62
3.2.	<u>Evolució de la glucèmia en dejú.....</u>	63
3.3.	<u>Determinació dels nivells d'insulina circulant i d'insulina pancreàtica.....</u>	65
3.4.	<u>Efecte de la insulina i de la GK sobre l'expressió de gens claus en el metabolisme.....</u>	68
3.4.1.	<u>Expressió d'insulina i glucoquinasa a múscul esquelètic.....</u>	68
3.4.2.	<u>Expressió de GLUT4 a múscul esquelètic.....</u>	69
3.4.3.	<u>Expressió de la fosfo-enolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) a fetge.....</u>	70
3.5.	<u>Test de tolerància a la glucosa i secreció d'insulina pancreàtica.....</u>	71
3.6.	<u>Evolució del consum de menjar i d'aigua.....</u>	74
3.7.	<u>Efecte de l'expressió d'insulina i de GK sobre la massa muscular.....</u>	75
3.8.	<u>Disminució de les complicacions secundàries.....</u>	76
4.	<u>Transferència de gens a múscul esquelètic de gos mitjançant vectors AAV1.....</u>	80
4.1.	<u>Transferència d'AAV1-GFP a múscul esquelètic de gos mitjançant injecció intramuscular.....</u>	80
5.	<u>Aproximacions de teràpia gènica en gossos diabètics mitjançant l'expressió d'insulina.....</u>	84
5.1.	<u>Anàlisi de la glucèmia en dejú.....</u>	84
5.2.	<u>Test de tolerància a la glucosa.....</u>	86
5.3.	<u>Expressió d'insulina pel múscul esquelètic.....</u>	88
5.4.	<u>Determinació dels nivells d'insulina i de pèptid C en sèrum.....</u>	89

5.5.	<i>Estudi de paràmetres sèrics</i>	91
V DISCUSSIÓ		94
VI CONCLUSIONS		110
VII MATERIALS I MÈTODES		112
1.	<u>Materials</u>	112
1.1.	<u>Soques bacterianes i vectors plasmídics</u>	112
1.2.	<u>Animals</u>	112
1.3.	<u>Reactius de treball</u>	113
1.4.	<u>Sondes</u>	114
1.5.	<u>Oligonucleòtids</u>	114
2.	<u>Mètodes</u>	115
2.1.	<u>Obtenció de DNA</u>	115
2.1.1.	<u>Transformació de cèl·lules d' E. Coli</u>	115
2.1.2.	<u>Obtenció de plasmidi a baixes concentracions</u>	115
2.1.3.	<u>Obtenció de plasmidi lliure d'endotoxines a altes concentracions</u>	116
2.2.	<u>Anàlisi del DNA</u>	117
2.2.1.	<u>Manipulació enzimàtica del DNA</u>	117
2.2.2.	<u>Gels d'agarosa</u>	117
2.2.3.	<u>Purificació de fragments de DNA per gene-clean</u>	118
2.3.	<u>Construcció de molècules híbrides de DNA</u>	119
2.3.1.	<u>Lligació de fragments de DNA</u>	119
2.3.2.	<u>Clontage dels plasmidis</u>	119

<u>2.4.</u>	<u>Preparació i anàlisi de l'RNA.</u>	120
2.4.1.	<u>Extracció d'RNA.</u>	120
2.4.2.	<u>Electroforesis del RNA en gels desnaturalitzants d'agarosa/formaldèhid.</u>	121
2.4.3.	<u>Anàlisi de RNA per "Northern blot" (hibridació DNA-RNA).</u>	122
<u>2.5.</u>	<u>Anàlisi del nivell d'expressió dels gens mitjançant real time PCR quantitativa.</u>	123
<u>2.6.</u>	<u>Producció de vectors adenoassociats.</u>	124
2.6.1.	<u>Transfecció de cèl·lules.</u>	124
2.6.2.	<u>Purificació del vector AAV.</u>	125
2.6.3.	<u>Titració de vectors AAVs.</u>	126
<u>2.7.</u>	<u>Inducció de diabetis experimental.</u>	128
2.7.1.	<u>Inducció de la diabetis experimental en ratolins mitjançant la injecció de estreptozotocina.</u>	127
2.7.2.	<u>Inducció experimental de diabetis en gossos mitjançant la injecció d'alloxan i Stz.</u>	129
<u>2.8.</u>	<u>Injecció de vectors adenoassociats a múscul esquelètic.</u>	130
2.8.1.	<u>Transferència d'AAV a múscul esquelètic de ratolins.</u>	130
2.8.2.	<u>Transferència d'AAV a múscul esquelètic de gossos.</u>	131
2.8.2.1.	Procediment d'anestèsia	131
2.8.2.1.	Injecció intramuscular d'AAV a múscul esquelètic	131
<u>2.9.</u>	<u>Test de tolerància a la insulina.</u>	132
<u>2.10.</u>	<u>Test de tolerància a la glucosa.</u>	132
<u>2.11.</u>	<u>Determinació dels paràmetres sèrics.</u>	133
2.11.1.	<u>Determinació de Glucosa.</u>	133
2.11.2.	<u>Determinació d'Insulina i de Pèptid C.</u>	133
<u>2.12.</u>	<u>Anàlisi histològica.</u>	135
2.12.1	<u>Anàlisi histològica del pàncrees.</u>	135
2.12.2.	<u>Anàlisi histològica del múscul tractat amb GFP.</u>	135
2.12.3	<u>Anàlisi histològica del múscul esquelètic amb hematoxilina-eosina.</u>	136

2.12.4	<u>Anàlisi histològica de les terminacions nervioses</u>	136
2.13	<u>Determinació del consum d'aigua i de menjar</u>	138
2.14	<u>Càlcul estadístic</u>	138
VIII BIBLIOGRAFIA		139

I. PRESENTACIÓ

Els pacients de diabetis tipus 1 desenvolupen greus complicacions secundàries degudes a què el tractament amb insulina subcutània no és capaç de mantenir una normoglicèmia permanent. Per això, la regulació eficient de l'homeòstasi de la glucosa representa un repte d'importància cabdal per al tractament de la diabetis.

El múscul esquelètic és el principal teixit responsable de la captació de la glucosa després de la ingesta. No obstant, la manca d'insulina que comporta la diabetis impedeix la correcta captació de la glucosa per part del múscul. Estudis previs al nostre laboratori havien demostrat que la producció basal d'insulina per part del múscul esquelètic d'animals diabètics, juntament amb l'expressió de l'enzim hepàtic de la glucoquinasa, produïa una acció sinèrgica que incrementava la captació de la glucosa per part del múscul, prevenint així l'aparició d'hiperglicèmia i d'alteracions metabòliques.

En aquest estudi s'ha dut a terme una nova aproximació de teràpia gènica per a la diabetis basada en l'expressió conjunta d'insulina i de glucoquinasa en el múscul esquelètic utilitzant vectors virals adenoassociats de tipus 1 (AAV1). Els ratolins diabètics tractats amb els vectors AAV1-Ins+GK varen recuperar i mantenir la normoglicèmia, tant en condicions d'alimentació com de dejú, al llarg de més de 4 mesos després de la inducció de diabetis experimental. A més, es va observar una normalització de la tolerància a la glucosa i de la ingesta de menjar i d'aigua. Així doncs, l'acció conjunta de la producció basal d'insulina i de l'activitat de la glucoquinasa haurien generat en el múscul esquelètic un "sensor" de la glucosa que permetria la correcta regulació de la

glucèmia en ratolins diabètics, evitant així l'aparició de complicacions secundàries.

Un dels principals reptes en el camp de la teràpia gènica és el pas dels protocols de transferència gènica des de models murins fins a models animals grans, com ara gossos. Per això, l'última part d'aquest estudi ha pretès iniciar els primers passos en aquesta direcció. L'administració d'un vector AAV1-Ins al múscul esquelètic d'un gos diabètic ha permès, en primer lloc, establir les condicions per a la transferència de vectors a múscul esquelètic de gossos diabètics; i en segon lloc, ha evidenciat la viabilitat d'aquest tractament per contrarestar la hiperglucèmia en condicions de dejuni, i per millorar-ne la tolerància a la glucosa.

Així doncs, els estudis realitzats en ratolins han demostrat l'eficàcia a llarg termini del tractament basat en l'ús de vectors adenoassociats per a la producció d'insulina i de glucoquinasa en el múscul esquelètic per contrarestar la hiperglucèmia diabètica i prevenir així l'aparició de complicacions secundàries. D'altra banda, els estudis portats a terme en un model caní han posat de relleu l'efectivitat preclínica de la tècnica en grans animals, com a pas previ al desenvolupament d'assajos clínics.

II. INTRODUCCIÓ

1. CONTROL DE L'HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA.

La glucosa és la principal font d'energia usada per les cèl·lules. Per tant, un bon control dels seus nivells en sang fa que sigui essencial per a l'organisme, ja que alteracions poden donar lloc a períodes d'hiperglucèmia o d'hipoglucèmia, que poden esdevenir crítics per a la supervivència. A més, la glucosa és un important modulador de l'expressió gènica en pràcticament tots els organismes. L'acció de la glucosa pot ser directa (mitjançada per ella mateixa o algun derivat metabòlic), o indirecta, a través de modificacions de la secreció d'hormones, com la insulina i el glucagó. La insulina i el glucagó són les hormones que regulen la homeòstasi de la glucosa a través de l'activació i la inhibició dels diferents gens clau en el control del metabolisme de la glucosa.

En una situació postprandial actuen tres processos en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa. En primer terme, en augmentar la concentració de glucosa en sang, les cèl·lules β del pàncrees produeixen i secreten insulina al torrent sanguini. Per altra banda, en resposta a l'augment dels nivells d'insulina circulant, el pàncrees disminueix la producció de glucagó, i per tant, en disminuir el glucagó circulant es bloqueja la producció hepàtica de glucosa. Finalment, augmenta la captació de glucosa dels teixits, en especial pel fetge, el múscul esquelètic i el teixit adipós, promogut per l'increment dels nivells de glucosa i d'insulina en sang. En dejú, el glucagó i altres factors hormonals i nerviosos són els encarregats de mantenir la normoglucèmia a través d'un increment de la producció hepàtica de glucosa, mitjançant l'estimulació de la gluconeogènesi i de la glucogenòlisi.

Per tant, qualsevol alteració que afecti la funcionalitat de la cèl·lula β , fetge, múscul o teixit adipós pot donar lloc a trastorns en l'homeòstasi de la glucosa, al desenvolupament d'intolerància a la glucosa o, fins i tot, a diabetis mellitus (DeFronzo, 1997).

1.1. Paper del múscul esquelètic en l'homeòstasi de la glucosa.

El múscul esquelètic pot utilitzar diversos substrats per obtenir energia: la glucosa, els àcids greixosos, els cossos cetònics i els aminoàcids. La utilització d'un o de l'altre ve en funció del grau d'activitat que requereixi. En condicions de repòs muscular, el principal combustible són els àcids greixosos, que provenen del teixit adipós i de la dieta. Quan hi ha demanda d'exercici físic la fibra muscular utilitza, d'àcids greixosos, cossos cetònics i glucosa captada de la sang. En una situació postprandial, la glucosa és captada pels diferents teixits perifèrics, i en aquest context, el múscul esquelètic és el que té més rellevància, ja que constitueix el 40% de la massa corporal i s'ha descrit que la seva contribució en la captació de glucosa circulant és aproximadament del 75% (De Fronzo, 1997).

La captació de la glucosa per part del múscul esquelètic es realitza a través de les proteïnes transportadores GLUT4 i GLUT1. Aquesta funció es realitza principalment mitjançant la difusió facilitada de GLUT4 i GLUT1, ja sigui de manera dependent com de manera independent d'insulina. En teixits sensibles a la insulina, com per exemple el múscul esquelètic, GLUT4 és el transportador predominant i GLUT1 té un paper més minoritari. S'ha demostrat que el múscul esquelètic expressa nivells baixos de GLUT1, cosa que permet assegurar-se

un aport mínim de glucosa. Aquest està localitzat a la membrana plasmàtica i és el responsable de la captació basal de glucosa independent d'insulina (Wright *et al.*, 1991; Mueckler, 1994; Rea i James, 1997). En canvi, la cèl·lula muscular expressa nivells relativament elevats de transportador GLUT4. En condicions basals el transportador es localitza en vesícules intracel·lulars i en resposta a l'estimulació amb insulina es transloquen les vesícules intracel·lulars que contenen GLUT4 a la membrana, i així, augmenten el transport de glucosa cap a l'interior de la cèl·lula (Furtado *et al.*, 2002) (Figura 1). Aquesta translocació sembla ser un mecanisme clau mitjançant el qual la insulina estimula la captació de glucosa per part del múscul (Rea i James, 1997).

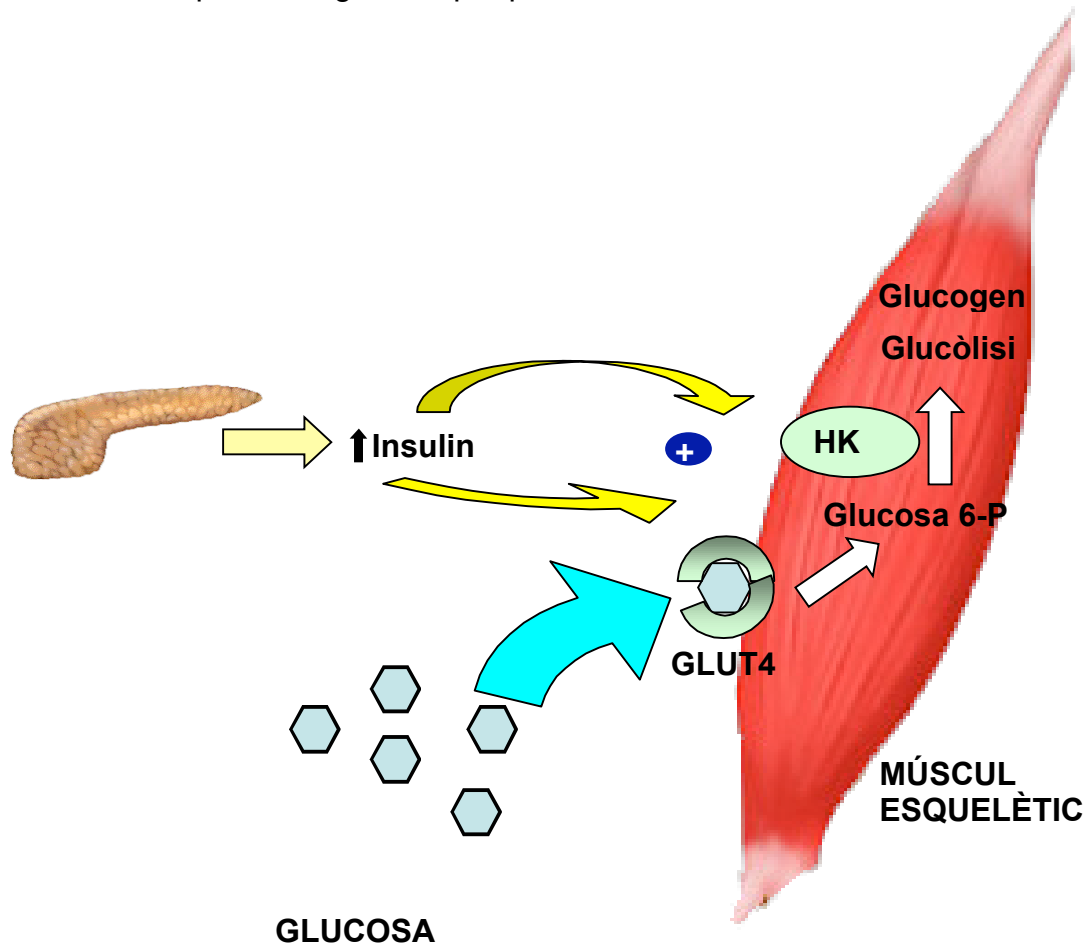


Figura 1. Paper del múscul esquelètic en l'homeòstasi de la glucosa

En una situació postprandial, la glucosa entra a dins la cèl·lula muscular gràcies a l'acció de la insulina. Un cop és a l'interior cel·lular, la primera reacció de la glucòlisis és portada a terme per membres de la família de les hexoquinases. Les hexoquinases I i II (HKI i HKII) són els isoenzims predominants en el teixit muscular, i la HKII és la responsable de la fosforilació de la glucosa en la captació estimulada per insulina (Doiron et al. 1994). L'activitat enzimàtica i els nivells d'RNA són inhibits quan els nivells d'insulina són baixos, o bé quan la senyal de la insulina està alterada. A més, també pot ser inhibida alostèricament pel producte de la reacció que catalitza, la glucosa-6-fosfat. Aquesta inhibició representa un mecanisme de control de la utilització de la glucosa a diferents teixits perifèrics, com el múscul esquelètic. Per tant, GLUT 4 juntament amb HK II constitueixen el primer pas en la utilització de la glucosa, i controlen la captació del sucre dependent d'insulina (Figura 1). D'altra banda, la HKI és la responsable de la fosforilació basal de la glucosa i, juntament amb el GLUT1, controlen la captació de glucosa no insulino-dependent. A més, estudis en animals transgènics que sobreexpressen HKII indiquen que, en condicions de hiperinsulinèmia i hiperglucèmia, la fosforilació de glucosa és el pas limitant en la captació de glucosa per part del múscul (Chang *et al.*, 1996).

La cèl·lula muscular no disposa de l'enzim glucosa-6-fosfatasa i per tant, la glucosa-6-fosfat resultant de la captació del sucre és per ús propi. La major part de la glucosa-6-fosfat que entra a la cèl·lula es transforma en glucogen i s'emmagatzema per poder ser utilitzada en períodes de contracció. La glucogen sintasa (GS) és un enzim clau en el control de la síntesi de glucogen regulada per insulina. S'ha demostrat en animals transgènics que

sobreexpressen GS en múscul esquelètic que el transport de glucosa no és el pas limitant per a la síntesi de glucogen (Mandarino, 1995), cosa que suggereix que l'activació de la GS, així com un augment del transport de glucosa, contribueixen a l'acumulació de glucogen en resposta a insulina en el múscul esquelètic. La resta del sucre es degrada cap a piruvat i aquest és convertit en acetil-CoA per entrar juntament amb els cossos cetònics al cicle de l'àcid cítric.

1.2. Estructura del múscul esquelètic.

La fibra muscular està formada per diferents cèl·lules que tenen una forma allargada i cilíndrica. Aquestes fibres estan unides entre si per un teixit de col·lagen anomenat endomisi. La unió de les fibres amb l'endomisi s'anomena fascicle, el qual està contingut en una capa de col·lagen lax (perimisi). El múscul esquelètic està format d'una agrupació de fascicles, els quals estan envoltats per una beina de teixit de col·lagen densa anomenada epimisi. En l'epimisi podem trobar grans vasos sanguinis i nervis que hi penetren i que es divideixen per ramificar-se pel múscul en el perimisi i l'endomisi (Figura 2).

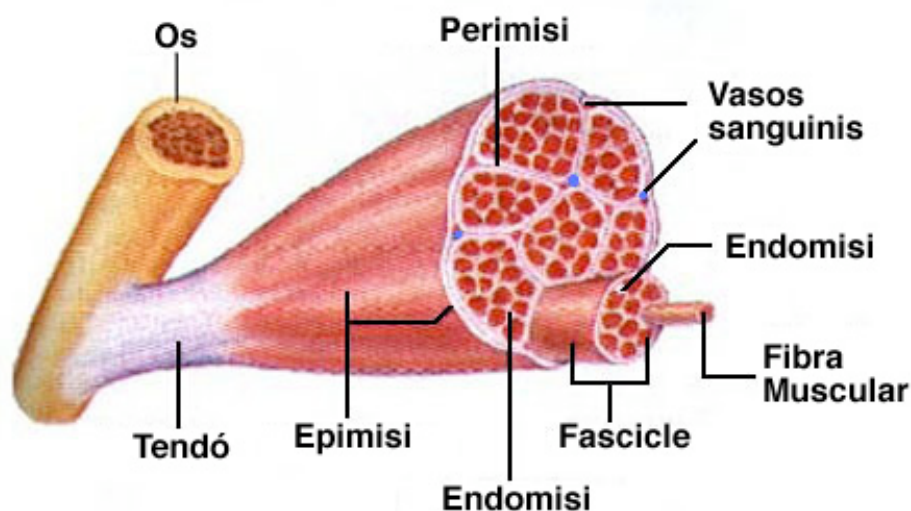


Figura 2. Estructura del múscul esquelètic

Podem trobar dos tipus de fibres musculars, les fibres de contracció lenta (tipus I) i les fibres de contracció ràpida (tipus II). Les necessitats metabòliques de cada fibra són diferents de manera que les fibres de tipus I són més vascularitzades i posseeixen una elevada quantitat de mioglobina, fet que justifica el color vermell d'aquests tipus de fibra. Tenen un elevat contingut mitocondrial i són de contracció lenta perquè fan servir majoritàriament un metabolisme aeròbic oxidatiu. Aquestes fibres acostumen a tenir un baix nivell de glucogen. Al contrari, les fibres de tipus II són grans i més blanquinoses. Tenen un baix contingut mitocondrial, una escassa quantitat de mioglobina i estan menys irrigades. Aquestes fibres fan servir un metabolisme majoritàriament anaeròbic. A més, són riques en glucogen i enzims glucolítics.

Els músculs *tibialis cranealis* i *gastrocnemius* estan situats a la pota, i el *quadriceps* està ubicat a la cuixa de les extremitats pelvianes posteriors i estan constituïts bàsicament per fibres de contracció ràpida. A més a més, aquests músculs són bons candidats per a la seva manipulació genètica mitjançant tècniques de transferència gènica donada la seva fàcil accessibilitat i facilitat de maneig (Rao *et al.*, 1996). A més a més, el paper del múscul en la homeòstasi de la glucosa fa que sigui un bon candidat per possibles teràpies relacionades amb la captació de glucosa per a disminuir la hiperglucèmia en la diabetis mellitus de tipus 1.

2. LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 1.

2.1. Introducció.

La incapacitat de l'organisme per regular correctament els nivells de glucosa pot donar lloc a l'aparició de la diabetis mellitus. La diabetis mellitus és la malaltia metabòlica més comú en humans i compren d'un 2 a un 7% de la població mundial, amb una gran varietat de símptomes i etiologies diferents.

D'un 5 a un 7% dels pacients es poden agrupar en la categoria de diabetis mellitus de tipus 1 o insulinodependent. Principalment, la malaltia apareix a individus joves, durant l'etapa de la infància i de l'adolescència, i està caracteritzada per la pèrdua de les cèl·lules β productores d'insulina dels illots pancreàtics degut a una destrucció autoimmune. Aquesta pèrdua de les cèl·lules β condueix a una manca total d'insulina, donant lloc a hiperglucèmia i a l'aparició de cetoacidosis. Per una banda, l'absència d'insulina redueix la captació i utilització de la glucosa per part dels teixits perifèrics sensibles a l'hormona, com per exemple el múscul esquelètic o el teixit adipós. D'altra banda, els nivells sanguinis de glucagó són més elevats que els d'insulina, incrementant la producció hepàtica de glucosa, degut a l'activació de les vies glucogenolítiques i gluconeogèniques. A més a més, es produeix una estimulació de la cetogènesi hepàtica deguda a la mobilització accelerada d'àcids greixosos lliures procedents del teixit adipós. Aquests seran oxidats al fetge a cossos cetònics, els quals s'alliberen en sang incrementant els seus nivells i donant lloc a cetoacidosi.

La hiperglucèmia crònica està associada a l'aparició de símptomes clínics característics de la malaltia: la polidípsia, la polifàgia, la poliúria i la pèrdua de pes (Pickup i Williams, 1994). A més a més, s'han descrit problemes gastrointestinals deguts a dèficits del sistema nerviós entèric, així com la neuropatia perifèrica, retinopatia i nefropatia que poden portar a complicacions secundàries a llarg termini, com per exemple disfuncions i fallides de diversos òrgans, especialment els ulls, els ronyons, els nervis, el cor, els vasos sanguinis, etc. (Pickup i Williams, 1994). També poden acompanyar a la hiperglucèmia crònica alteracions en el creixement i la susceptibilitat a certes infeccions. La hiperglucèmia crònica és la principal causant de les complicacions secundàries, i s'han suggerit diversos mecanismes responsables del desenvolupament de les complicacions secundàries: 1) la producció d'un increment en la via dels poliols, 2) un increment en la glucosilació de proteïnes i macromolècules intracel·lulars, 3) l'activació de la proteïna quinasa C o 4) l'increment de via metabòlica de les hexosamines (Brownlee, 2001).

En aquest tipus de diabetis, la teràpia substitutòria amb insulina és imprescindible, no només per evitar el desenvolupament de la hiperglucèmia sinó també per a evitar l'aparició de cetoacidosis espontània, que pot portar al coma diabètic, o fins i tot a la mort del pacient.

2.2. Factors implicats en el desenvolupament de la diabetis mellitus de tipus 1.

Els factors genètics i ambientals són determinants per a l'inici i la progressió del procés patològic de la diabetis mellitus de tipus 1. Per una banda, els factors genètics predisposen a desenvolupar la malaltia, i per l'altra, els factors ambientals poden activar els diferents mecanismes autoimmunes en individus genèticament susceptibles.

S'han proposat diferents orígens genètics en l'inici de la malaltia. La concordança entre dos bessons monozigòtics diabètics és del 25-50%, mentre que el risc relatiu individual amb antecedents familiars a desenvolupar diabetis és aproximadament del 5 al 10% (Field, 2002). Aquests resultats, comparats amb un 0.4% de risc en la població general, suggereixen una contribució genètica de la malaltia. Tot i així, la falta d'una concordança completa de desenvolupar diabetis en bessons monozigots indica la contribució d'un important factor ambiental a la patogènesi de la diabetis. Aquests factors ambientals no han estat encara ben definits, però s'han proposat diverses causes, com per exemple, la variació estacional o infeccions virals prèvies.

2.2.1. Factors genètics.

Estudis en ratolins i en humans han demostrat que l'origen de la diabetis no és monogènica amb un patró hereditari típic mendelià sinó que és d'un origen poligènic. S'han identificat més de 20 regions genòmiques anomenades intervals de susceptibilitat, les quals mostren diferents graus de relació amb el

desenvolupament de la malaltia (Field, 2002). Així, s'han estudiat regions com la del complex major d'histocompatibilitat (MHC), els antígens leucocitaris humans (HLA) o el locus del gen de la insulina com a possibles candidats. Estudis d'associació han identificat aquestes regions com a locus potencialment susceptibles i que presenten una major contribució al desenvolupament de la diabetis i s'han anomenat *IDDM1* i *IDDM2* (Field, 2002).

La regió *IDDM1* va ser el primer locus susceptible relacionat amb el desenvolupament de la diabetis de tipus 1, amb una contribució del 42%. Aquesta està localitzada dins del MHC i codificada per les proteïnes del HLA de classe I i classe II (proteïnes implicades en la presentació d'antígens a limfòcits T- CD8⁺ i CD4⁺, respectivament) (Field, 2002). L'MHC conté principalment 3 regions, A, B i C que codifiquen per gens de classe I, i la regió D, que codifica per gens de classe II. Les molècules de classe I són altament polimòrfiques i presenten fragments de pèptids d'antígens externs a cèl·lules T-citotòxiques. Les molècules de classe II són molècules relacionades amb la presentació d'antígens externs acabats de processar a cèl·lules T adjuvants i per tant, confereixen més risc, ja que estan involucrades en la iniciació de la resposta immunitària. S'ha observat que alguns haplotips del MHC (conjunt d'al·lels de MHC presents en l'individu) poden tenir un efecte predisposant o bé protector sobre el risc de desenvolupar la malaltia (Field, 2002).

La regió anomenada *IDDM2* té associat el locus del gen de la insulina i té una influència en el desenvolupament de la malaltia del 10%. En aquesta regió,

s'han trobat repeticions en tàndem de regions variables del gen de la insulina (Bennett *et al.*, 1995). S'ha observat que el nombre de repeticions en tàndem modula l'expressió del gen de la insulina, i això, confereix susceptibilitat a desenvolupar la malaltia (Lowe, 1998). Actualment, s'han identificat tres al·lels diferents. L'al·lel de classe I conté repeticions associades amb un increment de risc de partir diabetis de 5 vegades més gran. L'al·lel de classe II encara no està clar la seva associació amb l'origen de la malaltia. L'al·lel de classe III té un efecte protectiu dominant sobre la malaltia.

Tot i que les regions *IDDM1* i *IDDM2* estan involucrades aproximadament en un 50% de les incidències en l'etiopatologia de la diabetis de tipus 1 de causes genètiques, hi ha d'altres gens involucrats (HLA, CTLA4, IGFBP-2-5, D14S67, etc.). Molts d'aquests gens han estat confirmats com a susceptibles pel desenvolupament de la malaltia, però la complexitat de les interaccions fan que la seva funció encara no hagi estat descoberta.

2.2.2. Factors ambientals.

Diverses evidències suggereixen que diversos factors ambientals estan relacionats amb la predisposició a la diabetis mellitus de tipus 1. Tot i així, encara no es coneixen els factors ambientals que poden activar els mecanismes autoimmunitaris als individus genèticament susceptibles.

S'ha suggerit que diferents exposicions a virus, com per exemple els Coxsackie, el Rotavirus, el Citomegalovirus, el Retrovirus, el virus d'Epstein-Barr o el virus de la Rubèola, així com exposicions de virus a l'úter en casos

clínic, poden ser la causa d'inici de la malaltia (Zimmet *et al.*, 2001). En canvi, també s'han descrit la existència de factors ambientals que no indueixen l'aparició de la malaltia, sinó que la suprimeixen. Així, ratolins models de diabetis tipus 1, com ara els *Non-Obese Diabetic* o NOD, exposats a certs agents infecciosos presenten una menor incidència de diabetis (Atkinson i Leiter, 1999). Per tant, tot i que la diversitat de factors és molt gran, l'exposició a agents infecciosos en una etapa avançada de la vida pot tenir efectes protectius davant la malaltia. També, s'han investigat els efectes de les variacions estacionals en la incidència de la diabetis, i s'ha observat un increment durant la tardor i l'hivern. Aquesta variació estacional pot ser causada per la immunodepressió temporal deguda a la infecció d'un virus. També, s'ha proposat que l'exposició diària de l'antibiòtic produït per l'*Streptomyces*, present al terra i que pot infectar certs tubercles vegetals, pot ser la causa de la destrucció de la cèl·lula β en subjectes amb predisposició (Zimmet *et al.*, 2001). Tot i així, els agents ambientals que causen la patologia són difícils d'identificar a causa del llarg període entre la exposició a l'agent i la manifestació de la malaltia. A més, s'ha d'afegir la complexitat genètica i els múltiples estímuls requerits per iniciar la insulinitis.

Pel que fa a la dieta, estudis epidemiològics en humans han associat un increment del risc de desenvolupar diabetis mellitus de tipus 1 amb la substitució prematura de la llet materna per llet de vaca durant els tres primers mesos de vida (Gerstein, 1994; Norris i Scott, 1996). La ingestió de nitrosamines i una disminució del consum de vitamina D són altres factors de la dieta relacionats amb la patogenicitat de la diabetis de tipus 1. Les nitrosamines

estan presents normalment al fum del tabac i en carns fumades, mentre que s'ha observat que la vitamina D pot tenir un efecte modulador de la reactivitat del sistema immunitari (Gorus i Pipeleers, 2001).

L'estrès té un efecte cooperatiu en el desenvolupament de la malaltia. Aquest presenta un efecte modulador en el sistema immunitari i incrementa els nivells de glucosa en sang. L'augment de la glucèmia és produït per una estimulació en l'alliberació d'hormones contrareguladores, així com la inducció de certa resistència a l'acció de la insulina (Pickup i Williams, 1997).

2.3. Orígens de la diabetis mellitus de tipus 1.

La destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β pancreàtiques està caracteritzada per dos factors: resposta cel·lular i resposta humoral.

2.3.1. Resposta cel·lular.

La majoria de cèl·lules trobades en els illots infiltrats durant els primers estadis d'insulitis són macròfags i cèl·lules dendrítiques (Yoon i Jun, 2001). Aquesta infiltració precedeix la invasió dels illots per limfòcits T, cèl·lules NK i limfòcits B. S'ha demostrat que els macròfags tenen un paper essencial en l'activació de cèl·lules T contra les cèl·lules β pancreàtiques, causant-ne la seva destrucció que portarà al desenvolupament de diabetis (Jun et al., 2002).

Les citoquines produïdes per les cèl·lules T adjuvants (Th) juguen un paper important en la patogènesi de la diabetis. S'ha demostrat que les citoquines

produïdes per les cèl·lules Th1, (l'IL-2, l'IFN- γ i el TNF β), estan involucrades en el desenvolupament de la malaltia i donarien màxima activitat a les cèl·lules T CD8⁺. En canvi, les citoquines produïdes per les cèl·lules Th2 i Th3 (l'IL-4, l'IL-10 i el TGF- β) han estat involucrades en la prevenció de la diabetis (Yoon i Jun, 2001).

Tant les cèl·lules T CD8⁺ com les cèl·lules T CD4⁺ juguen un paper principal com a efectors finals en la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques (Kim *et al.*, 2002). Les cèl·lules CD8⁺, tot i tenir un efecte citotòxic directe sobre les cèl·lules β , també produeixen diferents citoquines inflamatores, com TNF β , TNF α i IFN γ , que estimulen l'apoptosi dins l'illot. Les cèl·lules CD4⁺ també poden estimular la l'apoptosi i destruir les cèl·lules β mitjançant l'activació de la via Fas.

2.3.2. Resposta humoral.

2.3.2.1. Paper de les citoquines.

Com s'ha indicat anteriorment, les citoquines són molècules sintetitzades i secretades per cèl·lules del sistema immune, macròfags i limfòcits, però també per cèl·lules no immunitàries, com els fibroblasts, les cèl·lules epitel·lials i els queratinòcits. Les citoquines són majoritàriament utilitzades pel sistema immune per comunicar-se de forma local o sistèmica durant una resposta immune o inflamatòria. Existeixen més de 30 citoquines diferents i generalment s'agrupen com: interleuquines (ILs), interferons (IFNs), factors de la necrosi

tumoral (TNFs) i factors estimuladors de colònia (CSFs). A més a més, aquestes molècules poden actuar de forma autocrina, paracrina i endocrina.

Nombrosos estudis han relacionat les citokines amb la diabetis autoimmune. S'ha demostrat que certes citokines (IL-1, TNF- α , TNF- β , IFN- γ) poden ser directament citotòxiques per les cèl·lules β , inhibint la secreció d'insulina, i combinades poden destruir les cèl·lules β de l'illot (Rabinovitch, 1998). A més a més, s'ha observat com l'IFN- β , IFN- α i IFN- γ , indueixen l'expressió de molècules MHC a cèl·lules d'illots pancreàtics (Rabinovitch, 1998).

2.3.2.2. Paper dels autoantígens.

S'ha observat que cèl·lules T CD4⁺ de pacients prediabètics proliferen en resposta a autoantígens de l'illot. Però el paper precís d'aquests autoantígens en el desenvolupament de la diabetis tipus 1 no és gens clar. Hi ha estudis que demostren la presència de cèl·lules T CD4⁺ Th1 reactives contra l'autoantigen GAD. Aquests estudis demostrarien el paper clau d'aquest autoantigen en la diabetis autoimmune (Zekzer *et al.*, 1998). També, s'han trobat clons de cèl·lules T CD8⁺ i cèl·lules T CD4⁺ reactives contra aminoàcids de la cadena B de la insulina (Wong *et al.*, 1999).

3. TRACTAMENT ACTUAL DE LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 1.

La teràpia actual d'aquesta malaltia està centrada a proporcionar una nova font d'insulina. La teràpia majoritàriament utilitzada és la teràpia substitutòria amb amb la hormona recombinant. A més, també s'està duent a terme en alguns pacients el trasplantament de pàncrees i el trasplantament d'illots. Totes aquestes actuacions terapèutiques van encaminades a millorar el control metabòlic del pacient diabètic, ja que s'ha demostrat que quan més estricte sigui el manteniment de la normogluccèmia, menor serà la predisposició a desenvolupar les complicacions secundàries.

3.1. Teràpia substitutòria amb insulina.

Aquest tipus de teràpia és la més utilitzada en pacients diabètics de tipus 1 i permet mantenir la normogluccèmia mitjançant l'obtenció d'un perfil insulinèmic en el pacient diabètic el més similar possible a un individu normal (uns nivells basals d'insulina baixos amb nivells elevats en situació postprandial).

El 1921, Banting i Best van descobrir la insulina, i aquesta es va comercialitzar ràpidament. Tot i així, les primeres insulines podien contenir substàncies tòxiques i molts dels pacients acabaven formant anticossos antiinsulina (Ionescu-Tirgoviste, 1996). Actualment, la insulina s'obté de manera biosintètica (recombinant) mitjançant la producció per bacteris modificades genèticament. També, es pot produir insulina semisintètica la qual s'obté en

substituir l'aminoàcid alanina de la insulina porcina per treonina, aconseguint una menor antigenicitat.

Per tal de mimetitzar els perfils insulinèmics s'usen dos tipus d'insulina exògena: preparacions d'insulina d'acció ràpida i preparacions d'insulina d'acció lenta. Les preparacions d'acció ràpida són utilitzades per a cobrir els requeriments postprandials d'insulina, ja que presenten un pic a les 1-2 hores i una duració de 6-8 hores després de la seva administració subcutània. La tendència de la insulina a associar-se en forma d'hexàmers en condicions fisiològiques dificulta la seva absorció i esdevé un dels principals obstacles per aconseguir un perfil fisiològic normal després de la injecció subcutània (Dimitriadis i Gerich, 1983). Per aquest motiu, mitjançant la modificació de la seqüència d'aminoàcids de la insulina, s'han obtingut diferents anàlegs de curta duració en els quals s'ha reduït la seva associació a altres molècules d'insulina, el que permet obtenir una absorció més ràpida (Brange, 1997; Bolli *et al.*, 1999). Les preparacions d'acció lenta són utilitzades per suplir la falta d'insulina durant els períodes nocturns. Aquestes es produeixen en acomplexar la insulina amb protamina o zenc, de manera que aquestes preparacions contenen agregats d'insulina soluble de diferents mides, els quals es van alliberant més lentament un cop són administrats subcutàniament. Les insulines d'acció lenta presenten un perfil d'acció més sostingut de fins 12-18 hores post injecció (Pickup i Williams, 1997). Les preparacions de llarga duració d'insulina tenen tres defectes farmacocinètics i farmacodinàmics importants: en primer lloc, el pic d'alliberació d'insulina lenta coincideix amb l'interval de temps en què menys requeriments d'insulina són necessaris, incrementant el risc

d'hipoglucèmia. En segon lloc, a les 5-6 hores després del pic d'acció hi ha una eliminació ràpida d'insulina, coincidint amb el període en que es produeix el fenomen del *down* (moment de menor sensibilitat a la insulina) en que es requereix una major quantitat d'insulina per evitar l'aparició d'hiperglucèmia en dejú. Finalment, la variabilitat existent en l'absorció d'insulina és molt elevada.

Els pacients diabètics poden utilitzar diversos règims d'administració d'insulina per obtenir uns nivells de l'hormona en sang que permetrien un bon control de la glucèmia. Entre els diferents règims establerts, la teràpia intensiva amb insulina s'ha descrit com el règim més adequat per assolir un control de la glucèmia més acurat. Aquesta està centrada en aconseguir la normoglucèmia mitjançant 3 o més injeccions diàries d'insulina o també mitjançant l'implant d'una bomba d'insulina. Aquest tipus de teràpia permet aconseguir un bon control de la glucosa, així com una reducció entre un 50 i un 70% de la progressió i el desenvolupament de les complicacions secundàries (DCCT, 1993). La rotació del lloc d'injecció és important per d'evitar l'aparició de lipohipertròfia i lipoatròfia (DCCT, 1993). Tot i així, aquesta teràpia no es pot dur a terme per tots els pacients diabètics, sent desaconsellable en nens o en persones grans, ja que requereix un control exhaustiu. A més, els pacients que segueixen aquest tractament intensiu d'insulina presenten un elevat risc d'hipoglucèmia.

Una alternativa a la teràpia per injecció subcutània són les bombes d'insulina les quals permeten la contínua perfusió d'insulina. El sistema consta d'un catèter que es posa al teixit subcutani amb un sensor que detecta els canvis en

la concentració de glucosa i un perfusor (bomba). Així, es pot programar la dosi d'insulina per hora que es vol injectar, i en el moment dels àpats, el mateix diabètic programa la dosi necessària segons l'àpat que va a menjar. Aquest sistema, millora considerablement els controls glucèmics, millora la llibertat d'actuació i d'horaris i redueix el número d'hipoglucèmies (Jaremko i Rorstad, 1998).

3.2. Transplantament de pàncrees.

Amb el transplantament de pàncrees s'aporten les cèl·lules β necessàries per a la producció d'insulina segons el requeriment fisiològic de l'organisme mitjançant la restauració de la funció endocrina, evitant així, els problemes secundaris que resulten dels períodes d'hiperglucèmia i hipoglucèmia. Aquesta aproximació podria evitar la necessitat d'injeccions periòdiques d'insulina i les restriccions dietètiques, revertint en una millora de la qualitat de vida i retardar les complicacions secundàries de la malaltia (Dubernard *et al.*, 1989). No obstant, no tots els pacients són aptes per a un transplantament de pàncrees i s'han definit tres grups candidats: diabètics insulíndependents en diàlisi, pacients amb transplantament renal i pacients en situació de preurèmia. L'implant utilitzat és d'un donant de menys de 50 anys, ja que pacients amb edat més avançada poden tenir pèrdua de teixit. Tot i així, existeix una manca de donants.

Tots aquestes avantatges del transplantament van acompanyades de grans riscos. El primer és que el procediment quirúrgic és molt complicat i pot arribar a un grau de mortalitat de fins al 10%. Aquesta mortalitat depèn molt directament

de l'edat i de l'estat de salut del pacient. El segon, és que s'ha d'establir una immunosupressió crònica del pacient, que pot provocar la formació de tumors i de complicacions renals a llarg termini (Pipeleers *et al.*, 2002). A més, existeix un rebuig del teixit en un 30 a 40% de les vegades (Konigsrainer *et al.*, 1992). Per tant, tot i que hi ha una estabilització de les complicacions secundàries (Landgraf, 1996), actualment no és una de les millors opcions per a la teràpia de la diabetis mellitus tipus 1.

3.3. Transplantament d'illots pancreàtics.

El transplantament d'illots ha esdevingut una alternativa més segura al transplantament de pàncrees, ja que no es trasplanta teixit exocrí, un dels causants de gran part de la mortalitat. A més, té l'avantatge que els illots poden ser tractats prèviament al transplantament, aconseguint d'aquesta manera reduir l'immunogenicitat. Aquesta teràpia requereix una tècnica quirúrgica molt menys violenta que el cas anterior, ja que permet trasplantar illots pancreàtics a diferents punts de l'organisme (com per exemple melsa, cavitat peritoneal, fetge, càpsules suprarenals, etc.) (Houwing *et al.*, 1997), els quals permeten un alliberament d'insulina a nivell perifèric (Davalli *et al.*, 1996; Napoli *et al.*, 1996). La capacitat dels implants a sobreviure al lloc d'implantació depèn, entre d'altres factors, de la capacitat dels illots trasplantats a reorganitzar-se al lloc d'implantació, desenvolupar terminacions nervioses i revascularitzar-se (Mendola *et al.*, 1997). El grup d'Edmonton ha realitzat el transplantament d'illots a diversos pacients diabètics de tipus 1 amb un nou règim immunosupressor lliure de glucocorticoids, cosa que ha permès obtenir un elevat percentatge d'èxit (Shapiro i Lakey, 2000). No obstant, la manca de

donants d'illots apropiats, el gran requeriment de teixit insular (es requereixen de 2 a 4 pàncrees per cada trasplantament) i la necessitat d'immunosupressió per tal d'evitar el rebuig de l'implant, així com la recidiva de la malaltia són actualment els principals problemes per a l'aplicació clínica del trasplantament d'illots (Ryan *et al.*, 2005).

Els resultats positius obtinguts amb el transplament, conjuntament amb la manca de donants d'illots pancreàtics ha portat a la recerca enfocada a l'obtenció d'una font alternativa de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules mare embrionàries i adultes (Ramiya *et al.*, 2000; Soria *et al.*, 2001; Miyazaki *et al.*, 2004; Segev *et al.*, 2004; Hao *et al.*, 2006). No obstant, tot i els avenços constants d'aquests estudis, encara es troben en fase d'investigació.

4. TERÀPIA GÈNICA.

4.1. Introducció a la teràpia gènica.

La teràpia gènica és una estratègia per a introduir gens forans dins de les cèl·lules, teixits o òrgan d'un individu amb una finalitat terapèutica, per tal de corregir o alleugerir símptomes d'una malaltia (Mulligan, 1993; Crystal, 1995)).

La teràpia gènica es pot classificar en dues categories depenent de l'estratègia usada en la introducció del material genètic a l'interior cel·lular. La primera és la teràpia gènica *ex vivo*, on les cèl·lules del teixit que es vol modificar genèticament són obtingudes mitjançant una biòpsia i cultivades *in vitro*. Un cop en cultiu aquestes es modifiquen genèticament mitjançant l'ús del vector adequat i posteriorment es reimplanten de nou en l'individu. La segona és la teràpia gènica *in vivo*, on les cèl·lules són modificades genèticament *in situ* mitjançant la transferència de vectors recombinants. Aquest tipus d'estratègia implica un major coneixement de la farmacocinètica clàssica respecte a la biodisponibilitat del vector, el destí i la distribució del vector, així com les relacions dosi-resposta (Anderson, 1998).

Durant els últims anys s'han utilitzat un gran nombre de vectors recombinants per introduir el material genètic a les cèl·lules. Aquests vectors es poden classificar en dues categories: no virals i virals. Els vectors no virals inclouen la injecció directa de DNA o l'encapsulació de DNA amb liposomes o polímers catiónics, com a sistema de transferència. Els vectors de transferència virals

utilitzen la capacitat natural d'infecció dels virus per transferir el DNA dins la cèl·lula diana i expressar les proteïnes d'interès. Tot i així, no s'ha descrit cap vector que pugui ser utilitzat àmpliament per al tractament de totes les malalties, sinó que el tipus de malaltia a tractar, les característiques del teixit afectat i els tipus cel·lular que s'ha de transferir seran determinants a l'hora de triar el tipus de vector.

Un cop transferit el material genètic a la cèl·lula diana mitjançant la teràpia gènica, el gen d'interès s'expressa i la proteïna fa la seva funció a nivell de la pròpia cèl·lula, de les cèl·lules veïnes o bé entra en circulació i arriba a un altre teixit diana (Blau i Springer, 1995). El material genètic pot ser introduït per afegir nous gens o per augmentar la dosi gènica (DelloRusso *et al.*, 2002), per a reemplaçar gens alterats, o bé per silenciar l'expressió de certs gens (Aoki *et al.*, 2003). Als anys 90 es van endegar diferents aproximacions per curar certes malalties monogenètiques, com per exemple, la deficiència d'adenosina deaminasa (ADA), fibrosis quística, etc. Actualment, s'estan utilitzant estratègies de teràpia gènica per un ventall molt més ampli de malaltia (Mountain, 2000).

4.2. Vectors virals recombinants.

El cos humà ha desenvolupat diversos sistemes de defensa per protegir-se contra els perills ambientals, com per exemple, els virus. No obstant, els virus han desenvolupat múltiples mecanismes per a superar aquestes barreres i ser capaços d'incorporar-se al genoma humà. Per aquest motiu, molts dels esforços en teràpia gènica s'han centrat en la utilització dels virus com a

vectors de teràpia gènica per incorporar gens terapèutics (vectors virals recombinants).

Els vectors virals han de ser modificats per tal que, a l'infectar la cèl·lula diana, no es puguin replicar. En aquest cas, la càpside vírica d'aquests vectors conté un genoma víric manipulat genèticament, de manera que només mantenen la capacitat d'infectar una cèl·lula i, per tant, la capacitat d'introduir gens terapèutic. Així, poden introduir el material genètic però sense poder replicar-se per donar lloc a nous virus (Kay *et al.*, 2001) (Figura 3).

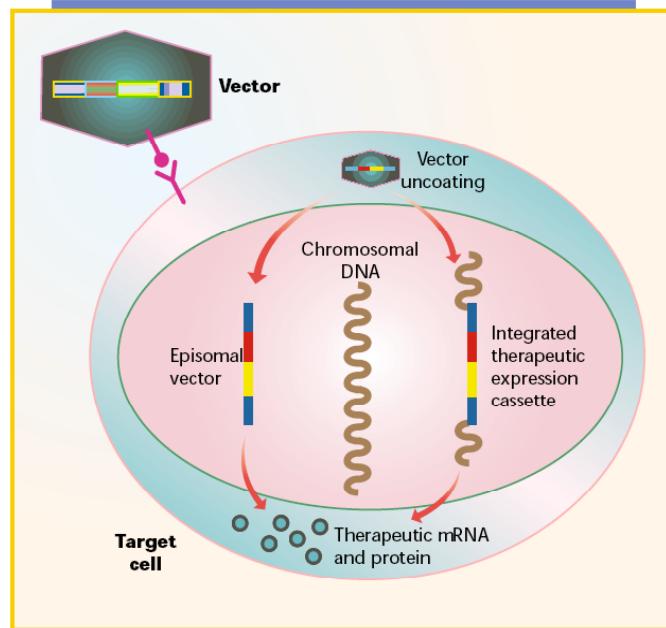


Figura 3. Transducció d'una cèl·lula diana per un vector viral. La partícula viral que conté el gen terapèutic s'uneix a la cèl·lula, normalment mitjançant un receptor específic, i entra dins la cèl·lula, fent que el seu genoma arribi al nucli. El genoma del vector, mitjançant processos complexes, acabaria en forma de dsDNA, que depenent del vector pot persistir episomalment o integrar-se al genoma. A partir d'aquí s'expressaria el gen terapèutic.

Per tant, el primer pas per al disseny d'un vector viral recombinant és identificar les seqüències virals requerides per a la replicació i l'empaquetament del genoma viral i el tropisme del virus a la cèl·lula hoste. Un cop identificades,

aquestes són eliminades del genoma viral per tal de reduir la replicació i la patogenicitat, així com l'expressió de possibles proteïnes immunogèniques del virus. Posteriorment, els gens d'interès i els reguladors d'elements transcripcionals referents al transgen són inserits al constructe viral, i es genera el vector viral recombinant. Actualment, existeix un número elevat de vectors recombinants que s'estan millorant contínuament. La Taula 1 resumeix alguna de les seves principals característiques.

Vector	Avantatges	Desavantatges
Adenovirus	Elevat tropisme. Gran capacitat de DNA (36kb). Pot infectar cèl·lules quiescents i cèl·lules en divisió. Localització episomal. Elevat títol de vectors virals. Elevats nivells d'expressió del transgen <i>in vivo</i> .	Provoca resposta immunològica i inflamatòria. Tropisme promiscu, infecció no controlada.
Vectors Adenoassociats (AAV)	Estabilitat elevada en lloc específic. Pot infectar cèl·lules quiescents i en divisió. No patogènic. Baixa immunogenicitat.	Poca capacitat d'empaquetament pel DNA (4.8kb). Possible integració a fetge.
Retrovirus (MMLV)	Expressió estable en cèl·lules en divisió. Elevat títol de virus.	Integració aleatòria en el genoma de l'hoste. Limitada capacitat de DNA (8Kb). Únicament infecta cèl·lules en divisió.
Lentivirus	Pot infectar cèl·lules quiescents i en divisió. Expressió estable durant llargs períodes de temps. No immunogènic.	Calen més estudis per garantir la manca de patogenicitat. S'integra dins el genoma hoste
Herpes simplex virus	Pot infectar cèl·lules quiescents i en divisió. Localització episomal. Gran capacitat de DNA (50 Kb).	Neurotoxicitat mal caracteritzada Expressió transitòria

Taula 1. Característiques generals dels vectors virals.

4.2.1. Vectors Adenoassociats recombinants.

Els vectors de tipus Adenoassociats (AAV) són un tipus de virus que pertanyen al gènere del dependovirus i a la família dels parvovirus. Els virus AAV es van identificar com a contaminants d'adenovirus humans.

4.2.1.1. Característiques generals del genoma viral.

El seu genoma original està constituït per DNA de cadena senzilla (ssDNA) d'aproximadament 4,7 kb i la seva estructura és icosaèdrica i sense envolta lípidica que la rodegi, amb un diàmetre d'uns 20 nm. L'AAV conté dos regions codificadores de gens virals (ORF): *rep* i *cap*. Aquests gens codifiquen per les proteïnes necessàries per a la replicació (*rep*) i la formació de la càpside viral (*cap*), i estan flanquejades per unes seqüències de repeticions terminals invertides (ITR). Les ITR són molt importants per a la replicació, per l'empaquetament i per a la integració (Samulski *et al.*, 1989; Srivastava *et al.*, 1989). Existeixen 4 tipus de proteïnes reguladores *rep* que són requerides per a la replicació i l'empaquetament (Rep78, Rep68, Rep52, i Rep40). Els ORF de les proteïnes *cap* codifiquen per tres tipus de proteïnes estructurals (VP1, VP2 i VP3) que són les encarregades de formar la càpside i estan generades per empalmament alternatiu.

4.2.1.2. Característiques dels vectors AAV recombinants.

Els vectors AAV recombinants no contenen cap regió que codifiqui per gens virals, i per tant, no hi ha cap toxicitat associada a l'expressió dels gens. El vector viral ha estat modificat substituint les seqüències de les proteïnes virals *rep* i *cap* amb un transgen d'interès. D'aquesta manera, per a la amplificació del vector AAV, les funcions de *rep* i de *cap* i els gens adenoviral necessaris per a la seva replicació (AdE1, E2A, E4 i VA RNA) poden estar substituïdes per un o dos plàsmids alternatius, cotransfectats en *trans* per a l'amplificació del vector viral *in vitro* (Matsushita *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1998).

Els virus AAV recombinants són un vector molt atractiu per a la transferència gènica, ja que permeten expressió a llarg termini sense cap tipus de patogenicitat en un elevat nombre de teixits i espècies incloent el múscul esquelètic (Kessler *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 1996; Kaspar *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2005).

Fins ara, s'han descrit diferents tipus de serotips d'AAV en humans, com el serotip 1, 2, 3 i 5. També s'ha descrit el serotip 4 en simis, el serotip de bovins i els d'aviars (Blacklow, 1988). Tot i així, a causa de que cada serotip té un tropisme cel.lular diferent s'han aïllat i caracteritzat 9 serotips amb al finalitat de desenvolupar nous vectors virals. Així, el serotip 6 es va caracteritzar i sembla ser una recombinació del AAV1 i l'AAV2 (Blankinship *et al.*, 2004). Més tard, es van caracteritzar quatre nous serotips provinents de primats no humans: AAV7, AAV8, AAV9 i rh10 (Gao *et al.*, 2002).

Els vectors virals AAV1, han demostrat ser molt eficients per transduir el múscul esquelètic. Això, permet una expressió a llarg termini, associada amb una resposta immunitària no gaire significant i amb poca reactivitat creuada amb els altres serotips, cosa que permetria la readministració amb un altre serotip (Chao *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2001; Riviere *et al.*, 2006). A més a més, el vector AAV1 ha estat molt eficient en la transferència a múscul esquelètic de gossos (Arruda *et al.*, 2004) i de primats (Chenuaud *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2005).

4.2.1.3 Transducció per part de vectors AAV de diferents tipus cel·lulars.

La transducció de diferents tipus cel·lulars depèn no només del serotip utilitzat sinó també de la via d'administració. En aquest sentit, els vectors poden ser administrats de manera sistèmica o de manera local. En el primer cas, la transducció té algun factor de risc, com per exemple la infecció a teixits no desitjats, com per exemple, les gònades o el fetge (Wang *et al.*, 2005). Per tant, una injecció local de virus disminueix el possible risc i també requereix una dosi menor de vectors.

4.2.1.4. Producció de vectors AAV.

Els vectors adenoassociats es produeixen mitjançant la triple transfecció en cèl·lules HEK-293 productores d'AAV dels plasmidis que codifiquen per a les proteïnes de la càpside viral; les proteïnes adenovirals adjuvants necessàries per a l'encapsidació; i el gen d'interès que serà encapsidat flanquejat per les ITRs. Els vectors es purifiquen mitjançant el gradient de clorur de cesi i una

posterior diàlisi per eliminar l'excés de ions. Un altre mètode alternatiu consisteix en la purificació del vector mitjançant un gradient de Iodixanol, utilitzat en clínica i menys tòxic (Zolotukhin *et al.*, 1999). La producció de vectors a gran escala es realitza mitjançant el mètode de cromatografia de líquids d'altra pressió (HPLC). Aquest mètode produeix vectors en grans concentracions, amb una elevada puresa, cosa que permet la seva utilització en assajos clínics en humans.

Paral·lelament, també s'estan desenvolupant altres tècniques per produir vectors recombinants a gran escala. En aquest sentit, s'està estudiant la substitució de la triple transfecció en cèl·lules HEK-293 per la utilització de Baculovirus i cèl·lules d'insecte (Urabe *et al.*, 2002).

4.2.1.5. Assajos clínics en humans amb vectors AAV.

Actualment, existeixen al voltant de 900 assajos clínics aprovats per a teràpia gènica a tot el món (66% de càncer, 9% de malalties vasculars i 8% de malalties infeccioses). Molts d'ells encara estan en fase I i molt pocs en fase III. De tots els assaigs clínics en humans vigents, al voltant d'11 protocols aprovats han utilitzat o estan utilitzant vectors del tipus AAV (www.clinicaltrials.gov/ct/action/getstudy).

El primer assaig clínic en humà utilitzant vectors AAV va ser realitzat fa deu anys en pacients de fibrosis quística (Flotte *et al.*, 1996). Actualment, s'han usat vectors AAV en molts assajos en humans, com per exemple en hemofília

(Manno *et al.*, 2003), en fibrosis quística (Moss *et al.*, 2004), distròfia muscular (Greelish *et al.*, 1999), AAT (Flotte *et al.*, 2004), parkinson (During *et al.*, 2001) i càncer (Warrington i Herzog, 2006) entre altres.

5. ESTRATÈGIES DE TERÀPIA GÈNICA PER A LA DIABETIS MELLITUS.

El tractament actual de la diabetis de tipus 1 es centra en la correcció de la manca d'insulina mitjançant l'administració subcutània d'insulina recombinant, o bé amb el trasplantament de pàncrees o illots. No obstant, aquests tractaments són imperfectes. Per aquest motiu, s'estan estudiant diverses aproximacions de teràpia gènica centrades en proporcionar un millor control de la glucèmia, les quals puguin suplir i/o millorar els tractaments actuals. Aquestes aproximacions estan centrades principalment en tres àrees: 1) Mecanismes per a prevenir la destrucció de la cèl·lula β i induir la seva regeneració. 2) Estratègies de teràpia gènica centrades en la manipulació del pàncrees endocrí i/o illots pancreàtics aïllats 3) Reducció de l'hiperglucèmia diabètica manipulant genèticament cèl·lules extrapancreàtiques perquè incrementin la captació de glucosa.

5.1. Desenvolupament de mecanismes de prevenció de la destrucció autoimmune de les cèl·lules β o d'inducció de tolerància.

La prevenció de la diabetis mellitus de tipus 1 implica la prèvia identificació dels pacients amb risc de patir la malaltia per tal de prevenir la destrucció autoimmune de les cèl·lules β mitjançant estratègies de teràpia gènica immunomodulatòria. Aquestes estratègies s'han demostrat en models animals diabètics (Jin *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004) i suggereixen la inducció de la tolerància a les cèl·lules β o la hiporesposta als autoantígens mitjançant: 1) l'increment la tolerància a partir de les cèl·lules T reguladores (Goudy *et al.*, 2003) 2) eliminant els limfòcits T per apoptosi (Jun *et al.*, 2002); 3) induint

tolerància a les cèl·lules β mitjançant la sobreexpressió del supressor de vies de citocines (SOCS-1) (Flodstrom-Tullberg *et al.*, 2003) o 4) induir les cèl·lules presentadores d'antigen per a expressar insulina, un dels principals autoantígens (Steptoe *et al.*, 2003).

Tot i així, aquesta àrea encara necessita molts estudis ja que falten encara molts marcadors predictius de la malaltia que siguin fiables en individus sans prediabètics. Per aquesta raó, els estudis s'han enfocat en aturar els mecanismes autoimmunes una vegada la malaltia s'ha iniciat, ja que aquest moment és molt més fàcil de diagnosticar en pacients diabètics (Herold *et al.*, 2002).

5.2. Estratègies de teràpia gènica centrades en la manipulació del pàncrees endocrí i/o illots pancreàtics aïllats.

Amb l'objectiu de modificar genèticament o expansionar la massa de les cèl·lules β del pàncrees s'estan estudiant noves aproximacions de teràpia gènica per transduir específicament les cèl·lules β pancreàtiques. Un punt clau per tal de modificar genèticament el pàncrees, és la selecció d'un vector i d'una ruta d'administració idònies. Fins ara, s'han usat diferents vectors per transferir gens a pàncrees *in vitro* amb èxit, però l'eficiència de transducció *in vivo* és molt baixa (Ayuso *et al.*, 2006). Actualment, s'estan enfocant els estudis per tal de transferir els illots *ex vivo*, previ al trasplantament per tal d'impedir el rebuig.

5.3. Producció d'insulina per teixits extrapancreàtics.

La producció d'insulina per part de cèl·lules extrapancreàtiques ha estat una de les estratègies més utilitzades en animals per suplir la manca d'insulina característica de la diabetis. La insulina pot ser produïda directament per la transferència del seu propi gen (Muzzin *et al.*, 1997; Abai *et al.*, 1999; Gros *et al.*, 1999; Riu *et al.*, 2002) o bé per la introducció d'un gen exogen que indueixi la reprogramació de cèl·lules mare en cèl·lules productores d'insulina (Ferber *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 2003).

L'expressió d'insulina per cèl·lules extrapancreàtiques té l'avantatge que les cèl·lules productores d'insulina no estan subjectes a l'atac autoimmune característic de la malaltia (Lipes *et al.*, 1996). No obstant, també presenta certes limitacions, com el fet que no totes les cèl·lules presenten les proteases específiques de la cèl·lula β necessàries per al processament de la proinsulina en insulina madura. Tot i així, la modificació del gen de la proinsulina a fi que aquesta pugui ser processada per altres proteases (com per exemple la endoproteasa furina) ha permès la producció d'insulina madura per part de les cèl·lules extrapancreàtiques. La furina reconeix un motiu de 4 aminoàcids els quals es poden introduir en el lloc d'unió entre el pèptid C i la cadena A i B de la proinsulina mitjançant manipulació genètica; això fa que obtinguem un correcte processament de l'hormona (Groskreutz *et al.*, 1994). Una avantatge d'aquesta aproximació és que el processament de la insulina produeix l'alliberació del pèptid-C, el qual és secretat conjuntament amb l'hormona. Diversos estudis indiquen que l'administració de pèptid-C en pacients diabètics té un efecte fisiològic important sobre les complicacions secundàries associades al

desenvolupament de la malaltia, tant a nivell renal com neuronal (Ido *et al.*, 1997; Wahren *et al.*, 2000)

5.3.1. Producció regulada d'insulina.

Durant els últims anys, diversos tipus cel·lulars han estat modificats genèticament per tal que expressin insulina de manera regulada. En aquest cas, la insulina produïda hauria de corregir totalment la deficiència de l'hormona mimetitzant-ne adequadament els perfils fisiològics.

Per a poder aconseguir una producció regulada d'insulina cal que la cèl·lula diana tingui un comportament similar a les cèl·lules β de l'organisme. Per tant, les cèl·lules diana han de tenir les peptidasses necessàries pel processament de la insulina, respondre a la glucosa per a una producció de l'hormona i la capacitat per secretar-la al torrent sanguini en el moment desitjat. No obstant, molts pocs tipus cel·lulars presenten totes aquestes característiques conjuntament, tot i que s'ha descrit que cèl·lules K de l'intestí podrien ser bones cèl·lules diana (Cheung *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1994). Un altre teixit candidat podria ser el fetge, ja que aquest té l'avantatge que presenta un sistema de sensor a la glucosa (GLUT2 i GK) semblant al de les cèl·lules β pancreàtiques, però té l'inconvenient que no conté els enzims requerits pel processament de la insulina, així com una via de secreció regulada, que permeti la secreció d'insulina per exocitosi en resposta a un estímul fisiològic extern. En aquest sentit, s'ha descrit que en ratolins transgènics diabètics l'expressió d'insulina per part del fetge permet contrarestar les alteracions diabètiques produïdes a nivell hepàtic, i, a la

vegada, reduir parcialment el desenvolupament de la hiperglucèmia (Valera et al, 1994).

També, s'ha provat la utilització de promotors regulables per glucosa, com el de la piruvat quinasa hepàtica (LPK) o Spot 14 (S14). Aquestes han estat una de les aproximacions utilitzades per tal d'obtenir una expressió i producció d'insulina pel fetge en resposta als nivells de glucosa en sang (Thulé et al., 2000; Lee et al., 2000). No obstant, la utilització d'aquests promotors regulats únicament per la glucèmia, no eviten el risc d'aparició d'episodis hipoglucèmics degut a un excés de la producció d'insulina. A més a més, la resposta transcripcional a la glucosa és lenta, fent que es retardi la secreció de l'hormona. Això pot portar a episodis hiperglucèmics després dels àpats i a hipoglucèmia unes hores més tard.

També s'estan desenvolupant molts esforços per tal d'aconseguir un millor control de la secreció d'insulina induïda per glucosa en cèl·lules endocrines manipulades genèticament o bé mitjançant l'ús de fàrmacs en hepatòcits (Rivera et al., 2004)

Tot i així, encara cap de les estratègies realitzades ha estat capaç de mimetitzar correctament el perfil fisiològic de secreció d'insulina produït per les cèl·lules β .

5.3.2. Producció constitutiva d'insulina conjuntament amb teràpia substitutòria.

Aquestes estratègies es basen en la manipulació de cèl·lules extrapancreàtiques perquè produeixin uns nivells basals d'insulina, els quals poden combinar-se amb un tractament substitutori convencional. D'aquesta manera, amb l'administració d'insulina exògena soluble, mimetitzariem els pics d'insulina fisiològics postprandials, i amb la teràpia gènica s'obtidria la producció d'insulina basal entre àpats. Així, probablement s'assoliria un millor perfil fisiològic d'insulina, el qual proporcionaria una millor homeòstasi de la glucosa.

S'ha descrit que l'expressió basal d'insulina millora significativament la teràpia convencional en animals diabètics (Gros, 1999; Dong et al., 2002). Diversos teixits extrapancreàtics han estat proposats com a teixits diana per a la producció basal d'insulina com per exemple el múscul esquelètic i el fetge (Mas et al. 2006; Abai et al., 1999; Gros et al., 1999; Riu et al., 2002; Martinegni et al., 2002; Dong et al., 2002). Aquestes teràpies permeten obtenir una millor tolerància a la glucosa i un millor metabolisme lipídic.

En aquest sentit, en el nostre laboratori hem aprofitat la capacitat del múscul esquelètic de produir proteïnes terapèutiques de manera sistèmica a fi d'assolir els nivells basals desitjats. Així doncs, la manipulació genètica del múscul esquelètic per què produeixi insulina ens permetrà obtenir nivells basals de l'hormona, i contrarestar-ne així la disminució associada al desenvolupament de diabetis. Per aquest motiu, varem obtenir uns ratolins transgènics que

expressaven el gen de la insulina humana en el múscul esquelètic sota el control del promotor de la cadena lleugera de la miosina (MLC) (Riu et al., 2002). Estudis previs han demostrat que les cèl·lules musculars són capaces de produir insulina funcional (Gros et al., 1999).

Els estudis realitzats al nostre laboratori en els ratolins transgènics diabètics han demostrat que la producció d'insulina per part del múscul permet normalitzar la glucèmia en dejú, sense cap risc hipoglucèmic, i millorar parcialment la glucèmia en alimentat (Riu et al., 2002). El múscul esquelètic presenta uns nivells elevats de receptor d'insulina (Lamothe et al., 1998; White et al., 1994), així doncs, la insulina produïda pel múscul té un efecte autocrí/paracrí sobre el propi múscul que incrementa la captació i la utilització de la glucosa i contribueix així a la reducció de la hiperglucèmia. No obstant, la limitació observada en aquest model transgènic és la inhibició de la HK II per part de la glucosa-6-fosfat, fet que evita assolir la completa normalització de la glucèmia (Riu et al., 2002).

Per altra banda, s'ha observat que animals que sobreexpressen insulina a múscul esquelètic la suplementació de la teràpia convencional amb una producció basal d'insulina permet assolir uns nivells de glucosa pròxims a la normoglucèmia en estat d'alimentació (Riu et al., 2002).

5.3.3. Increment de la captació de glucosa per les cèl·lules extrapancreàtiques.

Altres estratègies de teràpia gènica per a la diabetis mellitus de tipus 1 estan centrades en la manipulació genètica de cèl·lules extrapancreàtiques per tal que captin més glucosa mitjançant un increment de la seva fosforilació.

Per tal de recuperar la capacitat d'eliminació de glucosa dels teixits extrapancreàtics, en el nostre laboratori hem obtingut ratolins transgènics que expressaven l'enzim glucoquinasa (GK) al fetge i al múscul esquelètic. La GK és un enzim que regula la fosforilació de la glucosa a glucosa-6-fosfat i que és expressada en el fetge, en les cèl·lules β pancreàtiques i en les cèl·lules neuroendocrines del tracte intestinal i d'hipotàlem (Matschinsky, 1996; Matschinsky et al., 2006). Al contrari que les altres hexoquinases, la GK no és inhibida per la glucosa-6-fosfat i presenta una Km molt més elevada per la glucosa, fet que li confereix una major capacitat de fosforilació del sucre a altes concentracions, així com, en els teixits en els quals és expressada normalment, controlar el flux de glucosa en relació a les concentracions circulants (Matchinsky, 1996; Printz et al., 1993, Matchinsky et al., 2006).

En el nostre laboratori hem observat que la sobreexpressió del gen de la GK al fetge sota el control del promotor del gen de la PEPCCK en ratolins transgènics diabètics, permet assolir uns nivells pràcticament normalitzats de glucosa, de triglicèrids, d'àcids greixosos i de cossos cetònics. A més, l'expressió de gens relacionats amb la gluconeogènesi i la cetogènesi en aquests animals són similars als observats en els ratolins normals (Ferre et et al., 1996). Al mateix

temps s'ha observat que la teràpia combinada de baixes dosis d'insulina, juntament amb la expressió de la GK al fetge, condueix a una millora en el control de la glucèmia en ratolins diabètics (Morral et al., 2002). Tot i així, la sobreexpressió hepàtica de la GK és limitada a causa de l'acumulació de glucogen i greix en el fetge (Ferre et al., 2003).

Com alternativa al fetge, en el nostre laboratori hem proposat el múscul esquelètic com a teixit diana per a l'expressió de la GK hepàtica. Els estudis realitzats en els ratolins transgènics mostren que l'expressió de la GK en el múscul esquelètic dóna lloc a un increment de les concentracions de glucosa-6-fosfat i de glucogen, una reducció dels nivells d'insulina i de glucosa en sang, així com un increment en els nivells de lactat i un major dipòsit del sucre després de la realització d'un test de tolerància a la glucosa. Tot i així, en animals diabètics només permet reduir parcialment la hiperglucèmia, degut a que l'absència d'insulina dóna lloc a una disminució dels nivells de GLUT4 i redueix el flux d'entrada de glucosa cap a l'interior de la cèl·lula muscular. Així mateix, aquests animals tenen una ràpida i forta resposta hipoglucèmica a la insulina quan l'hormona és injectada, fet que indica que aquests són més sensibles al tractament amb insulina que els controls tractats (Otaegui et al., 2000).

De forma similar al que vam observar en els ratolins transgènics, estudis realitzats en ratolins diabètics mostren que el trasplantament de miotubs C₂C₁₂-GK, tan prèviament com després de la inducció de diabetis experimental, permet contrarestar el desenvolupament d'hiperglucèmia (Otaegui et al., 2002).

Tots aquests estudis suggereixen que la manipulació de les cèl·lules musculars per expressar GK permet incrementar la captació de glucosa per part d'aquest teixit. No obstant, la disminució del transport de glucosa cap a l'interior cel·lular és el principal escull per corregir completament el desenvolupament d'hiperglucèmia en aquests animals.

5.3.4. Increment en la captació de glucosa i de la producció d'insulina pel múscul esquelètic.

En el nostre laboratori ens vam proposar estudiar si la producció constitutiva d'insulina, juntament amb un increment de la captació i la utilització de glucosa per part del múscul, podrien contrarestar el desenvolupament d'hiperglucèmia diabètica.

Per tal de provar aquesta hipòtesi, es van obtenir ratolins doble transgènics que expressaven específicament a múscul esquelètic els gens de la insulina i la glucoquinasa. Després de la inducció de diabetis experimental aquests ratolins normalitzaven la glucèmia en dejú i milloraven els nivells de glucèmia en alimentació (Mas et al. 2006). A més a més, es van realitzar anàlisis dels paràmetres sèrics i estudis d'expressió gènica, de metabolisme hepàtic i muscular. Els resultats obtinguts mostraven que els ratolins doble transgènics mostraven una normalització de les alteracions diabètiques.

Per tant, aquests resultats suggereixen que la manipulació genètica del múscul esquelètic per produir constitutivament nivells basals d'insulina i incrementar la

captació i la utilització de glucosa mitjançant l'expressió de l'enzim hepàtic GK, podria esdevenir una teràpia alternativa als tractaments actuals per a la diabetis de tipus 1.

III. OBJECTIUS

Al nostre laboratori s'havia demostrat en animals transgènics que la manipulació genètica del múscul esquelètic per produir insulina constitutiva a nivells basals, conjuntament amb un increment de la captació i la utilització de glucosa mitjançant l'expressió de l'enzim hepàtic glucoquinasa podria esdevenir una teràpia alternativa al tractament de la diabetis mellitus de tipus 1. Per tant, l'objectiu general d'aquest treball va ser desenvolupar una nova estratègia de teràpia gènica a llarg termini centrada en la manipulació genètica del múscul esquelètic conjuntament amb insulina i glucoquinasa per tal de contrarestar la hiperglucèmia diabètica i prevenir el desenvolupament de complicacions secundàries. Aquest objectiu general es va dividir dos objectius concrets:

1. Contrarestar a llarg termini la hiperglucèmia en ratolins diabètics mitjançant l'expressió d'insulina i glucoquinasa a múscul esquelètic utilitzant vectors adenoassociats de serotip 1 (AAV1).

1.1. Caracteritzar la transducció del múscul esquelètic mitjançant la injecció intramuscular de vectors AAV1.

1.2. Analitzar l'efecte de l'expressió d'insulina a múscul esquelètic sobre la homeòstasi de la glucosa en ratolins diabètics.

1.3. Analitzar l'efecte a llarg termini de l'expressió conjunta d'insulina i de glucoquinasa a múscul esquelètic de ratolins diabètics en la normalització de la glucèmia i el desenvolupament de les complicacions secundàries.

2. Desenvolupar una estratègia de teràpia gènica preclínica en gossos diabètics basada en la manipulació gènica del múscul esquelètic per expressar insulina, utilitzant vectors AAV.

IV. RESULTATS

1. APROXIMACIONS DE TERÀPIA GÈNICA A LLARG TERMINI PER A LA DIABETIS MELLITUS: UTILITZACIÓ DE VECTORS ADENOASSOCIATS.

Actualment, està demostrat que els vectors adenoassociats (AAV) de serotip 1 (AAV1) transdueixen molt eficientment les fibres musculars de ratolins. A més a més, la injecció de vectors AAV1 a múscul esquelètic permet assolir l'expressió del gen d'interès a llarg termini (Riviere et al., 2006; Arruda et al., 2004). Per tant, per validar aquesta estratègia vam posar a punt la tècnica de teràpia gènica basada en la injecció de vectors AAV1 a múscul esquelètic de ratolí.

1.1. Transferència d'AAV1-GFP a múscul esquelètic de ratolí.

En primer lloc, per tal de determinar el nivell de fibres musculars transduïdes es va injectar un vector AAV1 que contenia el gen de la proteïna verda fluorescent (GFP) sota el control del promotor constitutiu del citomegalovirus (CMV-GFP) a ratolins CD1, de 2-3 mesos. La quantitat de vectors injectada va ser de 6×10^{10} genomes virals (vg) per múscul, i els músculs injectats van ser el *tibialis cranealis*, el *gastrocnemius* i el *quadriceps*. S'utilitzaren aquests músculs perquè són fàcilment accessibles, senzills d'injectar percutàneament pel procediment d'injecció i no es produeix dany muscular que afecti la locomoció del ratolí.

Transcorreguts 7 dies després de la injecció del virus, els animals van ser sacrificats, i els músculs es van extreure i es va analitzar histològicament

l'expressió de GFP en el múscul *tibialis cranealis*, *in toto*, mitjançant l'emissió de fluorescència verda en un microscopi estereoscopi (Figura 1A,B). També, es van realitzar estudis immunohistoquímics utilitzant un anticòs antiGFP en seccions del múscul esquelètic. L'anàlisi morfomètric d'aquest teixit va demostrar que al voltant del 80% de les fibres musculars eren transduïdes (Figura 1C,D). Aquests resultats indicaven que l'AAV1 és un bon candidat a l'hora de transduir el múscul esquelètic de ratolí.

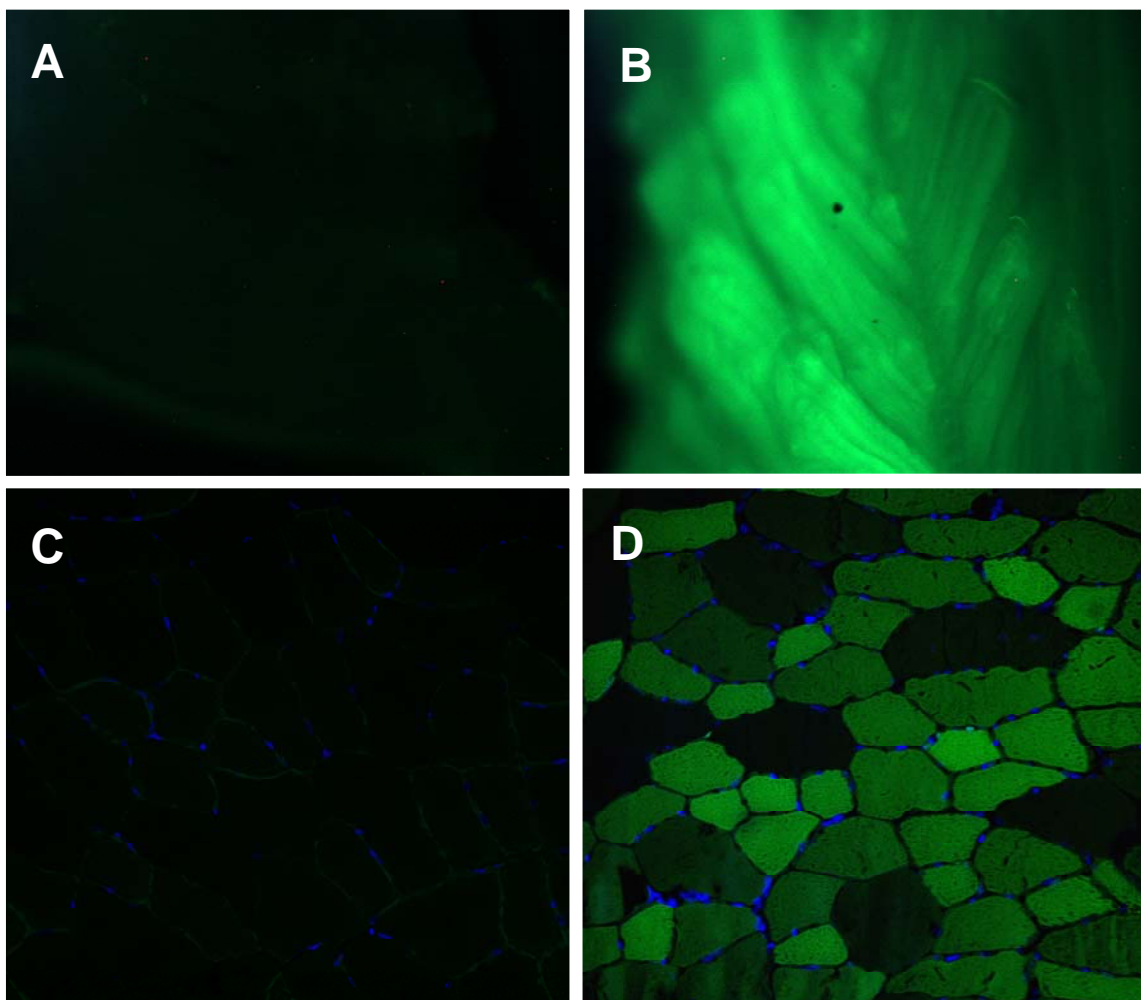


Figura 1. Anàlisi histològic del *tibialis cranealis* transduït amb AAV1-GFP. Set dies després de la transferència gènica, es van obtenir el múscul control (A,C) i el múscul tractat amb AAV1-GFP (6×10^{10} vg/múscul) (B, D). L'expressió de GFP va ser analitzada per emissió de fluorescència amb microscopi estereoscopi de fluorescència (A,B) i per anàlisi immunohistoquímic utilitzant un anticòs antiGFP en un microscopi de fluorescència (C,D). Augments originals 40x.

1.2. Determinació dels possibles efectes secundaris al múscul i al fetge.

A continuació, es van determinar els possibles efectes secundaris produïts en els músculs transduïts amb el vector AAV1. En primer lloc, es va determinar un possible efecte citotòxic a múscul esquelètic degut al vector viral. Així, al cap d'una setmana després de la injecció de vectors, es varen realitzar diferents talls histològics dels músculs de ratolins control i de ratolins tractats amb vectors AAV1-GFP. Seccions dels diferents músculs es van tenyir mitjançant hematoxilina-eosina per analitzar el possible dany muscular. Aquesta tinció permet estudiar la morfologia de la cèl·lula muscular i el grau d'infiltració inflamatòria associat a les diferents condicions de l'estudi. Es va observar que els ratolins tractats amb AAV1-GFP presentaven una morfologia totalment normal, amb fibres musculars amb els nuclis perifèrics i sense cap tipus d'infiltració limfocitària degut a una possible resposta immune en front al virus (Figura 2).

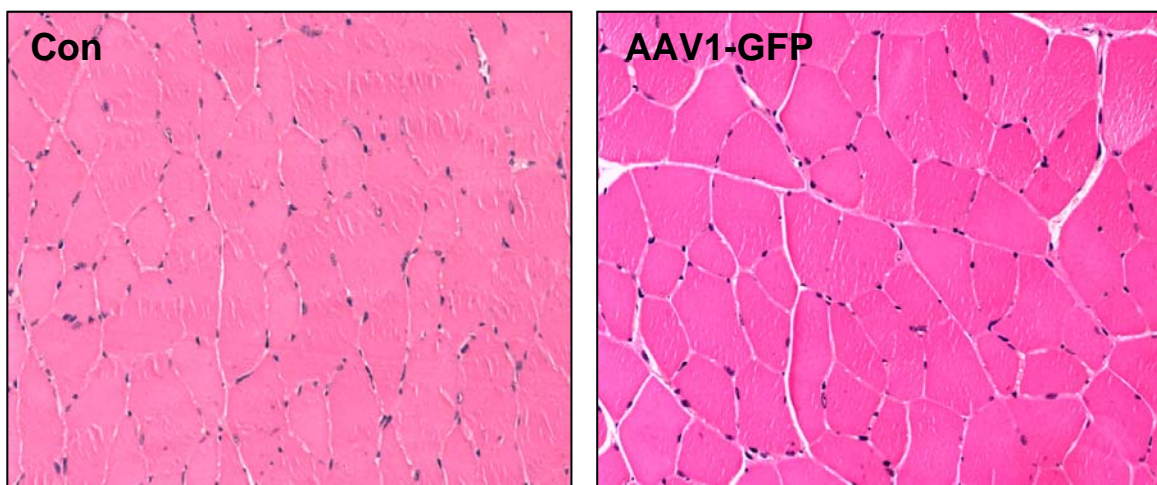


Figura 2. Anàlisi histològic dels músculs *tibialis cranealis* tractats amb virus AAV. Es mostren talls representatius dels músculs tractats amb vectors AAV1-GFP (6×10^{10} vg/múscul) tenyits amb hematoxilina-eosina: múscul control sense injectar (Con) i múscul injectat amb virus (AAV1-GFP). Augments originals 20x i 40x, respectivament.

També, es va determinar si la injecció intramuscular de vectors AAV1 a múscul esquelètic pot resultar en una dispersió sistèmica del vector a d'altres parts de l'organisme. Així doncs, es va injectar al *tibialis cranealis* de ratolins sans una dosi elevada de 1×10^{11} vg totals de vectors AAV1-GFP i, al cap d'una setmana, es va analitzar mitjançant RT-PCR l'expressió del gen GFP a fetge, a melsa, pulmons i gònades. No obstant, no es va observar expressió del gen de la GFP a cap teixit en animals que havien estat tractats intramuscularment amb una elevada dosi d'AAV. Per tant, aquests resultats indiquen que molt probablement el vector viral no va passar a circulació sanguínia, i així no va poder infectar d'altres teixits. D'altra banda, estudis previs amb vectors AAV1 ja havien demostrat que el tropisme d'aquest vector a fetge de ratolí era molt baix (Hauck et al., 2003; Xiao et al., 1999).

Així doncs, la primera part d'aquest estudi confirmava que els vectors AAV1 injectats intramuscularment podrien ser de gran utilitat per a transferir gens d'interès a múscul esquelètic de ratolí per a la teràpia gènica de la diabetis. Per tant, aquests tipus de vectors es van utilitzar en tots els estudis posteriors d'aquest treball.

2. EFECTE DE L'EXPRESSION D'INSULINA A MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATOLINS DIABÈTICS.

El múscul esquelètic és un dels principals òrgans responsables de la captació de glucosa, ja que és capaç de captar el 70% de la glucosa postpandrial. A més a més, és un òrgan accessible i fàcil de manipular. Per tant, podria ser un bon candidat per a ser manipulat genèticament per tal de contrarestar la hiperglucèmia diabètica.

Així doncs, vam estudiar si una producció basal d'insulina de manera constitutiva per part del múscul esquelètic podia incrementar la captació de glucosa, i així contrarestar la hiperglucèmia diabètica, i a més a més, tenir un efecte sobre altres teixits.

Amb aquest objectiu es va induir la diabetis experimental a ratolins CD-1 de 2-3 mesos d'edat mitjançant múltiples dosis d'estreptozotocina (Stz) (45 mg/kg durant cinc dies consecutius). Aquest tractament porta al desenvolupament de diabetis mellitus tipus 1, degut a que indueix una destrucció autoimmune de les cèl·lules β del pàncrees. Quan els ratolins tractats amb Stz presentaven una glucèmia al voltant de 250 mg/dl es van dividir en tres grups i es van tractar amb vectors AAV1. Els músculs *tibialis cranealis* i *gastrocnemius* es van transduir amb un vector AAV1 que contenia el gen de la insulina sota el promotor constitutiu del CMV (CMV-Ins). Es van emprar dues dosis de vectors diferents, una baixa de 1.6×10^{10} vg i una altra més elevada de 2.4×10^{10} vg per ratolí.

2.1. Anàlisi de la glucèmia dels animals tractats amb AAV1-Ins.

En primer lloc es va determinar l'evolució de la glucèmia dels diferents grups d'animals en estat alimentació al llarg del temps. Tant els ratolins Stz-Con, com els ratolins diabètics tractats amb la baixa dosi d'AAV-Ins varen desenvolupar hiperglucèmia diabètica (Figura 3A). En canvi, els ratolins tractats amb una dosi més elevada van mostrar una disminució de la glucèmia respecte els controls diabètics i un retard en l'evolució de la hiperglucèmia diabètica (Figura 3A).

Aquests resultats suggerien que el nivell d'expressió d'insulina a múscul esquelètic és determinant per contrarestar la hiperglucèmia diabètica, ja que existia una relació directa entre el nivell d'expressió, i per tant de producció d'insulina, i l'evolució de la glucèmia. A més a més, una major dosi d'insulina retardava l'evolució de la diabetis, ja que les glucèmies van augmentant al llarg del temps, però sempre és mantenien més baixes que les dels animals control diabètics.

Paral·lelament, es va estudiar si els diferents nivells de producció d'insulina del múscul esquelètic podien contrarestar la hiperglucèmia diabètica després d'un dejú de 16 hores. Els animals control tractats amb Stz presentaven una marcada hiperglucèmia en dejú, en canvi, els ratolins tractats amb ambdues dosis d'AAV1-Ins eren normoglucèmics (Figura 3B). Aquesta normalització de la glucèmia es mantenia al llarg del temps. Això indicava que la manipulació genètica de les cèl·lules musculars per a produir insulina permetia assolir nivells de glucosa en sang en ratolins diabètics similars als observats en

animals sans en dejú. A més a més, l'expressió constitutiva d'insulina en el múscul esquelètic no va provocar episodis d'hipoglucèmia

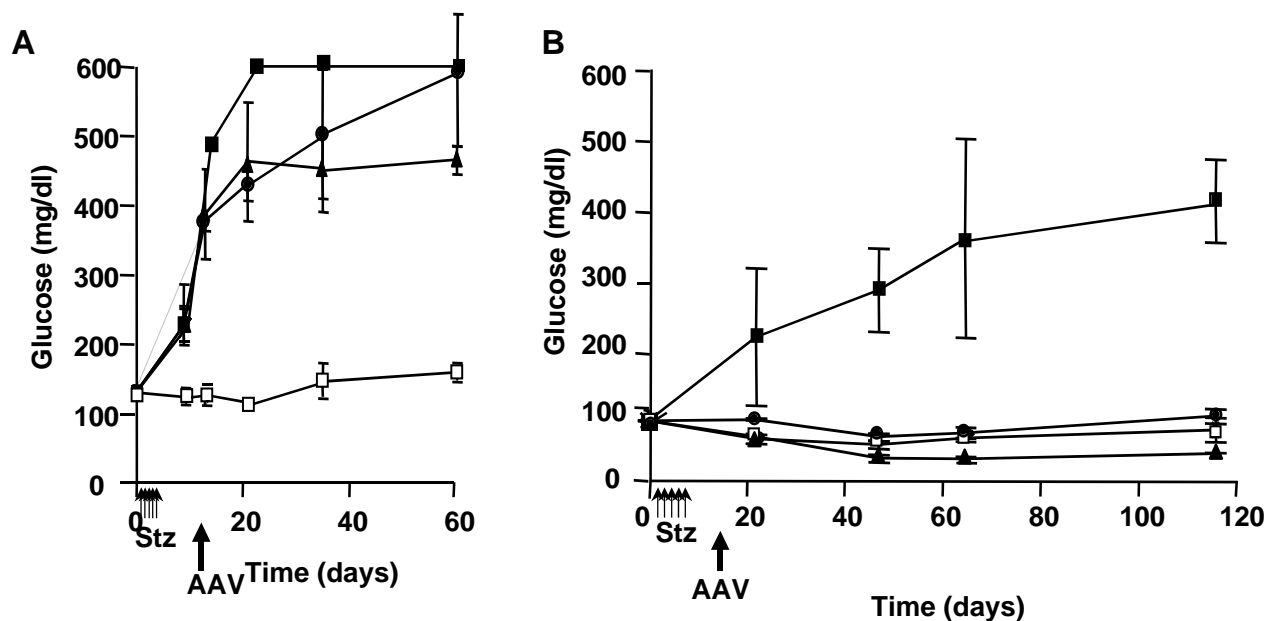


Figura 3. Evolució al llarg del temps dels nivells de glucosa en sang de ratolins alimentats (A) i dejunats (B). Les glucèmies es van determinar en estat d'alimentació (A) i després d'un dejú de 16 hores (B) en animals control (□), en animals tractats amb Stz control (■) i transduïts amb AAV1-Ins (1.6×10^{10} vg (●) o 2.4×10^{10} vg (▲) vg). Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 10 ratolins per grup.

2.2. Determinació dels nivells d'insulina en sèrum.

A continuació, es va estudiar si la producció d'insulina per part dels músculs dels ratolins diabètics tractats amb AAV-Ins permetien recuperar els nivells de l'hormona en sang. Així doncs, 60 dies després del tractament amb Stz es van mesurar els nivells totals d'insulina circulant (murina mes humana).

Els nivells sèrics d'insulina dels ratolins controls tractats amb Stz eren molt inferiors als observats en els ratolins control sans (Figura 4A). En canvi, tant els

ratolins tractats amb la dosi de 1.6×10^{10} vg, com els ratolins tractats amb de 2.4×10^{10} vg, varen presentar uns nivells d'insulina un 30% inferior als observats en els ratolins sans. Tot i així, estudis previs, han mostrat que només al voltant del 70% de la insulina produïda pel múscul esquelètic és processada correctament i la resta és secretada en forma de proinsulina (Gros et al., 1997; Riu et al., 2002). Per tant, part de l'hormona detectada en sèrum dels ratolins tractats amb AAV1-Ins seria proinsulina, la qual és 100 vegades menys activa que la insulina madura.

Al mateix temps, per tal de determinar que la insulina detectada era molt probablement insulina humana i no de ratolí, es va determinar el contingut d'insulina pancreàtica en els mateixos grups d'animals. En els animals tractats amb Stz vam observar una reducció en el contingut de l'hormona pancreàtica, assolint uns valors aproximadament un 95% més baixos respecte al control normal (Figura 4B). Això indicava que s'havia reduït dràsticament la massa de cèl·lules β del pàncrees. Llavors, els valors de la insulina circulant observats correspondrien molt probablement a la insulina humana produïda pel múscul esquelètic i no a la produïda pel pàncrees del ratolí.

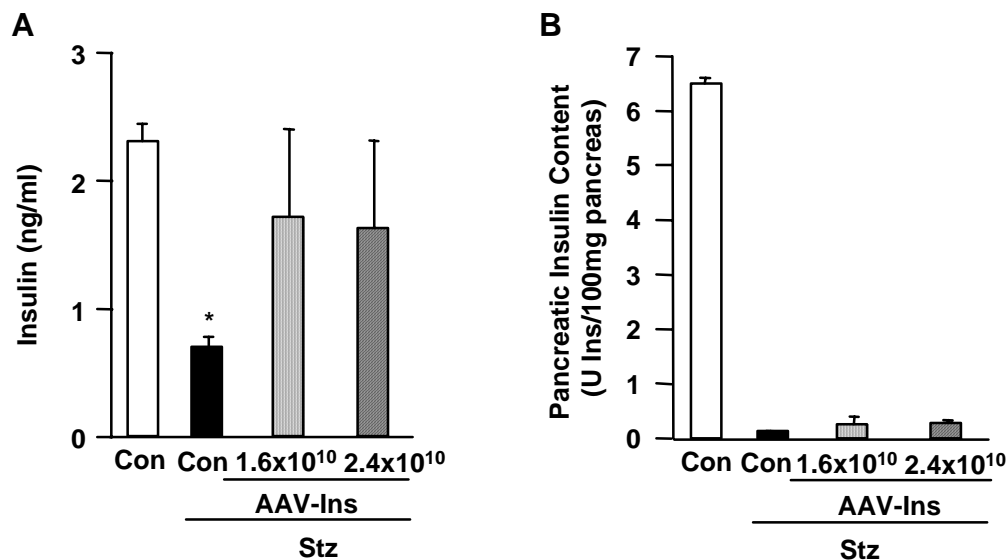


Figura 4. Nivells d'insulina circulant en sèrum i contingut pancreàtic de l'hormona. Al cap de 60 dies després del tractament amb Stz es van analitzar els nivells d'insulina total en sèrum (A) i el contingut d'insulina pancreàtica (B) dels diferents grups de ratolins: animals sans (Con), animals tractats amb Stz (Stz-Con) i tractats amb AAV1-Ins (1.6×10^{10} vg i 2.4×10^{10} vg) tal com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 6 ratolins per grup. * $p < 0,05$ vs Con

2.3. Expressió d'insulina a múscul esquelètic.

Per tal de comprovar que les dues dosis d'AAV utilitzades permetien obtenir diferents nivells d'expressió d'insulina a múscul esquelètic, 60 dies després del tractament amb Stz, es van sacrificar els animals i es van extreure els músculs. A continuació, es va obtenir l'RNA total i es va analitzar mitjançant Northern blot. Posteriorment, es va hibridar amb una sonda que contenia el cDNA de la insulina. Es va observar que el grup tractat amb 2.4×10^{10} vg presentava una expressió molt més elevada que el grup tractat amb 1.6×10^{10} vg (Figura 5). El fet que al dia 60 després del tractament amb AAV1-Ins s'observava una elevada expressió d'insulina a múscul esquelètic, indicava que s'assolia una expressió de l'hormona a llarg termini.

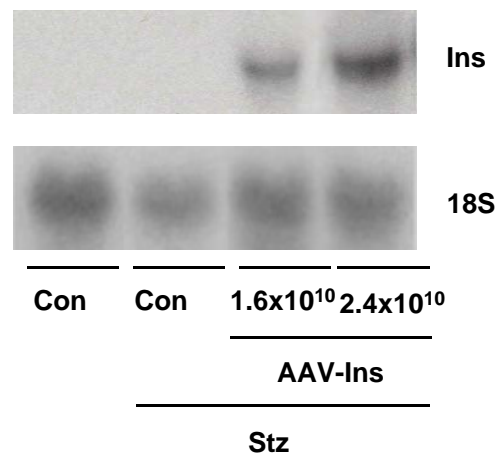


Figura 5. Expressió d'insulina humana a múscul esquelètic de ratolins diabètics. Seixanta dies després del tractament amb Stz es va extreure l'RNA total dels músculs *tibialis cranealis* i *gastrocnemius* del grup control sa, el grup tractat amb Stz control i tractat amb AAV1-Ins. Es presenta un Northern blot representatiu hibridat amb la sonda de cDNA específica per insulina i per 18S.

Aquests resultats feien palès que les dues dosis d'AAV-Ins injectades a múscul esquelètic es corresponien amb una major o menor expressió d'insulina. A més a més, l'elevada expressió d'insulina observada en utilitzar la segona dosi d'AAV1-Ins explicaria la diferència en els resultats obtinguts en les glucèmies i les insulínèmies.

El transportador de membrana GLUT4 és la principal isoforma de proteïna implicada en el transport de la glucosa a l'interior de la cèl·lula en teixits sensibles a la insulina. L'absència d'insulina característica de la diabetis dóna lloc a una disminució de la captació de glucosa per part del múscul esquelètic. Aquest fet es deu, en part, a una reducció del transport de glucosa com a conseqüència d'un descens dels nivells d'expressió del transportador GLUT4. Així doncs, es va obtenir l'RNA total dels músculs tractats amb AAV dels diferents grups de ratolins i es va analitzar per Northern blot l'expressió de

GLUT4 en el grup control sa, el grup control diabètic i els grups diabètics tractats amb les dues dosis d'AAV-Ins.

Es va observar que els controls diabètics presentaven una disminució en l'expressió de GLUT4 degut a l'absència d'insulina en sang (Figura 6). En canvi, en els ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins, tant amb la dosi de 1.6×10^{10} vg com amb la dosi de 2.4×10^{10} vg, s'observava una normalització de l'expressió d'aquest gen (Figura 6).

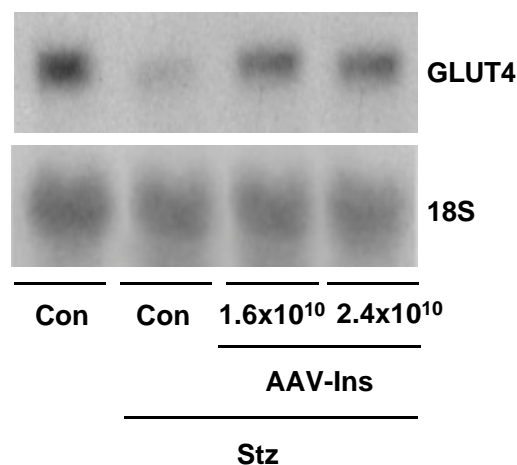


Figura 6. Expressió de GLUT4 a múscul esquelètic. Als 60 dies després del tractament amb Stz, es van analitzar per Northern blot els nivells d'expressió de GLUT 4 en els diferents grups d'animals: controls normals sans (Con), controls diabètics (Stz-Con), i tractats amb AAV1-Ins (1.6×10^{10} vg i 2.4×10^{10} vg). Es presenta un Northern blot representatiu hibridat amb les sondes de cDNA específiques de GLUT 4 i 18S.

Aquests resultats indicaven que la producció d'insulina a nivell local, mantenia els nivells d'expressió de GLUT4 a múscul esquelètic. A més, aquesta millora en l'expressió de GLUT4 suggeria que la insulina produïda pel múscul esquelètic actuava de manera autocrina i paracrina en el propi múscul.

2.4. Evolució del consum de menjar i d'aigua.

La polidípsia i la polifàgia són dos dels símptomes clínics més característics en pacients diabètics tipus 1, els quals estan directament associats amb el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica. Amb la finalitat d'estudiar si la millora de la glucèmia mitjançant la producció constitutiva d'insulina per part del múscul esquelètic era capaç de contrarestar l'aparició d'aquests símptomes, es van mesurar el consum d'aigua i menjar dels ratolins.

L'experiment es va realitzar 30 dies després del tractament amb Stz en el grup de ratolins control sans (Con), en el grup control diabètic (Stz-Con) i en el grup diabètic tractat ambdues dosis d'AAV1-Ins. El grup diabètic control presentava un increment en el consum de menjar del voltant de dues vegades respecte al control normal (Figura 7A). En canvi, els grups tractats amb AAV1-Ins presentaven un menor consum de menjar comparat amb el control diabètic (Figura 7A). A més, el grup tractat amb la dosi de 2.4×10^{10} vg la millora de la polifàgia era major que el grup tractat amb 1.6×10^{10} vg.

Pel que fa al consum d'aigua, un mes després del tractament amb Stz els ratolins control manifestaven una clara polidípsia, ja que presentaven un consum d'aigua del voltant de 3.5 vegades superior al dels ratolins controls sans (Figura 7B). En canvi, els grups tractats amb AAV1-Ins, presentaven una gran millora del consum de líquid, tot i que no arribava a ser com la del control sa. Per tant, la producció d'insulina a múscul esquelètic portava a una millora en el metabolisme de l'animal que finalment, contrarestavava la polidípsia i la

polifàgia característica de l'estat diabètic. Tant la millora de la polidípsia, com la millora de la polifàgia depenien de la dosi de vector viral administrada, i per tant, de la quantitat d'insulina produïda pel múscul esquelètic.

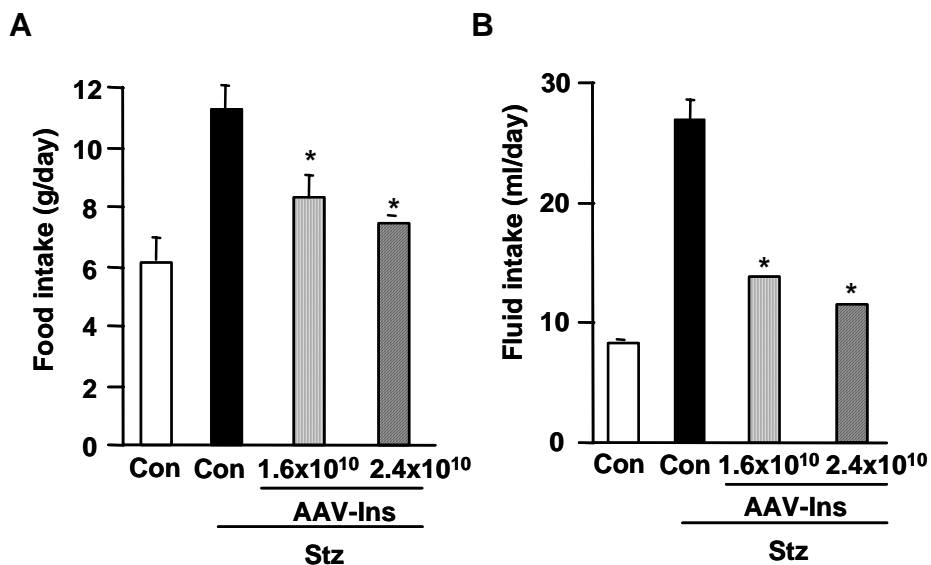


Figura 7. Consum de menjar (A) i d'aigua (B). Un més després de tractament amb Stz es va analitzar el consum de menjar i el consum d'aigua a ratolins controls sans (Con), controls diabètics (Stz-Con), i diabètics tractats amb AAV1-Ins (1.6×10^{10} vg i 2.4×10^{10} vg). Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 8 ratolins per grup. * $p < 0,05$ vs Stz-Con.

2.5. Efecte de l'expressió d'insulina sobre la massa muscular.

La manca d'insulina incrementa la proteòlisi muscular, la qual permet subministrar aminoàcids que seran els precursors gluconeogènics al fetge. Aquest fet, porta a una reducció gradual de la massa muscular. A l'estudiar si l'expressió d'insulina al múscul esquelètic podia revertir la pèrdua de massa muscular associada a l'estat diabètic, es va determinar el pes dels 4 músculs tractats amb vectors AAV1-Ins (*tibialis cranealis*, i *gastrocnemius*), 2 mesos després del tractament amb Stz. Així, es va observar que els ratolins control tractats amb Stz havien perdut una elevada quantitat de massa muscular (al

voltant d'un 30%) (Figura 8). En canvi, els ratolins tractats amb AAV1-Ins presentaven una massa muscular similar a la dels controls sans (Figura 8).

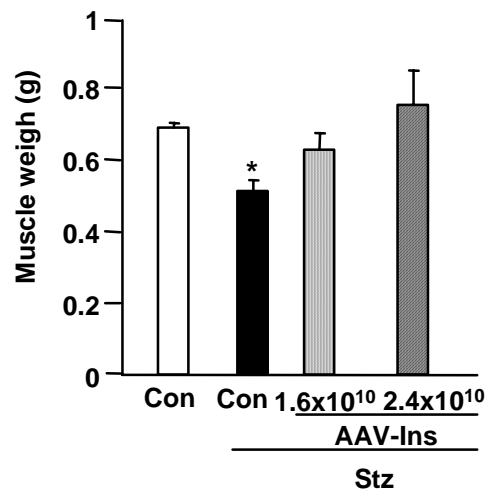


Figura 8. Pes del teixit muscular d'animals modificats genèticament. Es va determinar el pes de teixit muscular dels animals control, animals diabètics control i tractats amb AAV-Ins amb la dosi de de 1.6×10^{10} i la de 2.4×10^{10} 60 dies després del tractament amb Stz. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 7 animals per grup. * $P < 0.05$ vs. control sa.

2.6. Test de tolerància a la insulina.

El tractament amb AAV1-Ins indicava que la insulina produïda pel múscul esquelètic era suficient per normalitzar la glucèmia en situació de dejuni però no en situació d'alimentació. Per tal de normalitzar la glucèmia en alimentació, vàrem estudiar la resposta que tindria l'administració d'una dosi baixa d'insulina exògena soluble (d'acció ràpida) conjuntament amb l'expressió d'insulina constitutiva a múscul esquelètic.

Així, 45 dies després de la inducció de diabetis experimental vam administrar als ratolins controls i als ratolins tractats amb Stz, una dosi baixa d'insulina

exògena (0,30 IU/Kg) i a continuació, es va seguir l'evolució de la glucèmia al llarg del temps. El grup Stz-Con mantenia una marcada hiperglucèmia i arribava a baixar només un 20% la seva glucèmia original (Figura 9A). En canvi, els animals tractats amb AAV1-Ins amb una dosi de 1.6×10^{10} vg milloraven ràpidament la seva glucèmia fins a reduir la hiperglucèmia al voltant d'un 40%, però no assolien del tot la normoglucèmia (Figura 9B). Per altra banda, el grup tractat amb una dosi de 2.4×10^{10} vg d'AAV1-Ins, l'administració d'insulina exògena permetia una disminució significativa en els nivells en sang de glucosa, i assolia la normoglucèmia, la qual era mantinguda durant la resta de l'experiment (Figura 9B). No es van observar en cap moment períodes d'hipoglucèmia.

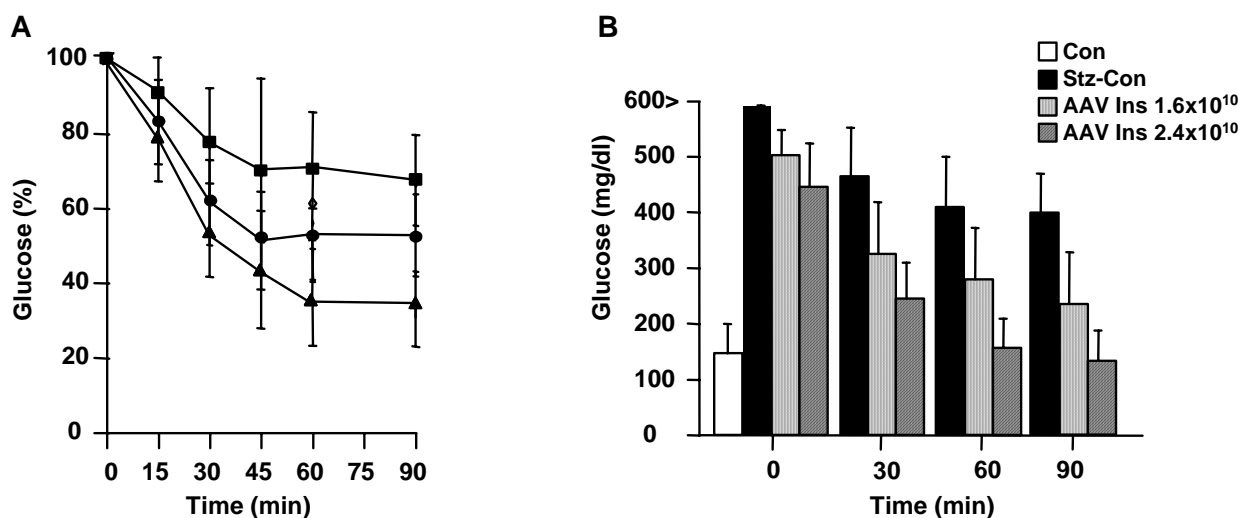


Figura 9. Test de tolerància a la insulina. (A) Percentatge de disminució de la glucèmia respecte el temps i (B) valors absoluts de glucèmia respecte el temps. Al cap de 45 dies després del tractament amb Stz es va injectar 0,30 U/Kg d'insulina soluble a ratolins controls diabètics (■) i a ratolins transduïts amb AAV1-Ins (1.8×10^{10} (●) o 2.4×10^{10} (▲) vg) i se'ls va analitzar els nivells de glucosa en sang al llarg del temps. Les mostres de sang es van prendre a partir de la vena caudal en els temps indicats. Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 6 animals en cada grup. * $p < 0,05$ vs Stz-Con.

Aquests resultats suggerien que una producció basal d'insulina produïda pels músculs *tibialis cranealis* i *gastrocnemius* hauria sensibilitzat la maquinària de captació de glucosa, augmentant així l'activitat de la hormona quan s'administrava exògenament. Així doncs, una producció d'insulina constant per part del múscul esquelètic, conjuntament amb l'administració de dosis baixes d'insulina exògena soluble mantenia la normoglucèmia en animals diabètics en estat d'alimentació.

Per tant, tots aquests resultats demostraven que l'expressió d'insulina per part del múscul esquelètic permetia normalitzar la hiperglucèmia en dejú i millorar les condicions generals de l'animal. Tot i així, la producció d'insulina de manera constitutiva per part del múscul esquelètic no era capaç per si sola de revertir la hiperglucèmia en alimentació. Així doncs, era necessari millorar l'estratègia per tal de contrarestar completament les alteracions diabètiques.

3. EFECTE DE L'EXPRESSION CONJUNTA D'INSULINA I DE GLUCOQUINASA A LLARG TERMINI EN ANIMALS DIABÈTICS.

Per tal de millorar la teràpia anterior es va estudiar la possibilitat de modificar genèticament el múscul esquelètic perquè expressi insulina, conjuntament amb l'enzim glucoquinasa (GK). La GK incrementa la fosforil·lació de la glucosa, ja que té una K_m molt més elevada que la HKII, cosa que el permet captar glucosa quan les concentracions circulants són elevades. A més, no és inhibida pel substrat glucosa-6-P.

Per tal d'obtenir expressió a llarg termini dels gens d'insulina i de GK vam utilitzar vectors AAV1 per transferir els gens al múscul esquelètic de ratolí. Per això, es va introduir en un vector AAV1 el gen de la GK, sota el promotor constitutiu del Citomegalovirus (CMV-Ins, CMV-GK), i es va obtenir el vector AAV1-GK. A continuació, ratolins CD-1 de 2 mesos d'edat es van tractar amb Stz i es van estudiar els canvis metabòlics en els animals tractats, que se'ls havia administrat els vectors AAV1-Ins i AAV1-GK (AAV1-Ins+GK) respecte els no tractats.

3.1. Anàlisi de la glucèmia dels animals diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK.

En primer lloc es va estudiar com podia afectar una coexpressió d'insulina i de GK per part del múscul esquelètic al desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica. Al cap de 12 dies després del tractament amb Stz, els ratolins presentaven una glucèmia al voltant de 250 mg/dl i es van dividir en 4 grups. A continuació, es va injectar una dosi de 1×10^{10} , 6×10^9 i 4×10^9 vg (50% AAV1-Ins i 50% AAV1-GK) als músculs *tibialis cranealis*, *quadriceps* i *gastrocnemius* de les dues cames (dosi de vector total per ratolí de 6×10^{10} , 3.6×10^{10} i 2.4×10^{10} vg, respectivament).

En estat d'alimentació, els ratolins tractats amb 2.4×10^{10} vg presentaven una reducció parcial de la hiperglucèmia. En canvi, els animals tractats amb la dosi de 3.6×10^{10} vg assolien una normalització completa de la glucèmia. A més, aquests ratolins van mantenir la normoglucèmia durant tot el període d'estudi (més de 4 mesos) (Figura 10).

No obstant, es va observar que els animals tractats amb la dosi més alta (6×10^{10} vg) presentaven uns nivells de glucosa en sang lleugerament més baixos que els controls sans i que el grup tractat amb 3.6×10^{10} vg (Figura 10). Aquests resultats, juntament amb el fet que el tractament amb la dosi de 2.4×10^{10} vg d'Ins+GK només millorés la glicèmia parcialment, feia pensar que la dosi gènica d'insulina i GK era determinant a l'hora d'assolir normoglucèmia.

Així doncs, aquest estudi suggeria que una vegada iniciat el procés diabètic, la modificació genètica de les cèl·lules musculars per tal de produir insulina i GK podia revertir el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica en alimentació.

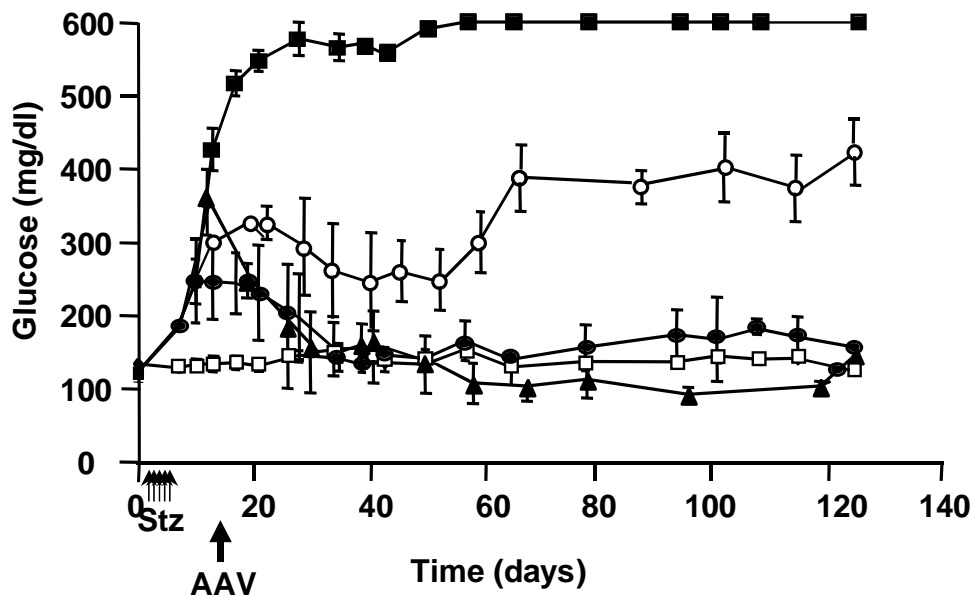


Figura 10. Evolució al llarg del temps dels nivells de glucosa en sang en ratolins alimentats *ad libitum*. Les glucèmies van ser determinades en animals control sans (□), en animals control tractats amb Stz (■) i en ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK (6×10^{10}) (▲), 3.6×10^{10} (◻) i 2.4×10^{10} (○) vg d'una barreja de virus AAV1-Ins i 50% d'AAV1-GK. Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 10 ratolins per grup. * $p < 0,05$ vs STZ-Con.

3.2. Evolució de la glucèmia en dejú.

Paral·lelament, es va estudiar si els diferents nivells d'expressió d'insulina i de GK produïda pel múscul esquelètic podien contrarestar la hiperglucèmia diabètica en un estat de dejú. Així, es va observar que els animals control tractats amb Stz, presentaven una marcada hiperglucèmia després d'un dejú de 16h (Figura 11). En canvi, els ratolins tractats amb vectors AAV1-Ins+GK

amb una dosi de 3.6×10^{10} o de 2.4×10^{10} vg presentaven una normalització de la glucèmia, la qual es mantenia al llarg del temps (Figura 11).

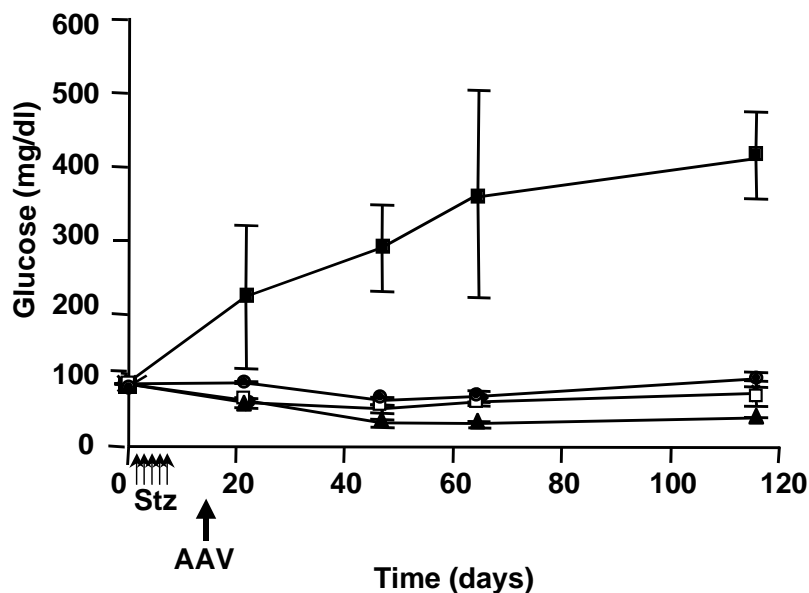


Figura 11. Evolució al llarg del temps dels nivells de glucosa en sang en animals dejunats. Les glucèmies veren ser determinades en animals control sans (□), en animals tractats amb Stz (■) i amb ratolins diabètics transduïts amb AAV1-Ins+GK (2.4×10^{10} (●), 3.6×10^{10} (◻) i 6×10^{10} (▲)vg d'una barreja de 50% d'AAV1-Ins i 50% d'AAV1-GK). Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 10 ratolins per grup. * $p < 0,05$ vs STZ-Con.

Aquest resultat indicava que la producció basal d'insulina per part del múscul esquelètic produïa els nivells necessaris per mantenir la normoglicèmia entre àpats, i que, a més a més, l'alta K_m per la glucosa de la GK assegurava que el múscul esquelètic no incrementés la captació de glucosa quan els nivells de sucre eren baixos. No obstant, els ratolins diabètics tractats amb la dosi total de 6×10^{10} vg mostraven una tendència a desenvolupar hipoglicèmia en condicions de dejuni. Això indicava que els nivells d'expressió d'insulina i de GK eren probablement massa alts (Figura 11). Així doncs, la dosi de vectors AAV1 de 3.6×10^{10} vg era més idònia, ja que no s'observava cap període hipoglicèmic i a més a més, normalitzava la glucèmia en alimentació. Per tant, tots els estudis

realitzats a continuació es varen realitzar en animals diabètics tractats amb aquesta dosi d'AAV1-Ins+GK.

3.3. Determinació dels nivells d'insulina circulant i d'insulina pancreàtica.

A continuació, es va estudiar si els ratolins diabètics transferits amb vectors AAV1 recuperaven els nivells de l'hormona en sang. Així doncs, després del tractament amb Stz es van mesurar els nivells circulants d'insulina de ratolí i també d'insulina total (humana + ratolí) en els diferents grups.

En tots els animals tractats amb Stz vam observar una reducció de la insulinèmia murina al llarg del temps, assolint uns valors aproximadament un 90% més baixos respecte al control (Figura 12). També, els nivells d'insulina total circulant dels ratolins control tractats amb Stz eren molt inferiors (reducció del 90%) als nivells observats en els ratolins control sans (Figura 12). Aquests resultats indicaven que el pàncrees dels animals tractats amb Stz no produïa insulina, probablement degut a la mort de les cèl·lules β pancreàtiques. En canvi, els nivells d'insulina total observats en els ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK (3.6×10^{10} vg) eren molt més elevats (Figura 12). Això indicava que la diferència entre els valors d'insulina total i d'insulina específica de ratolí, es correspondria a la insulina humana produïda pel múscul esquelètic.

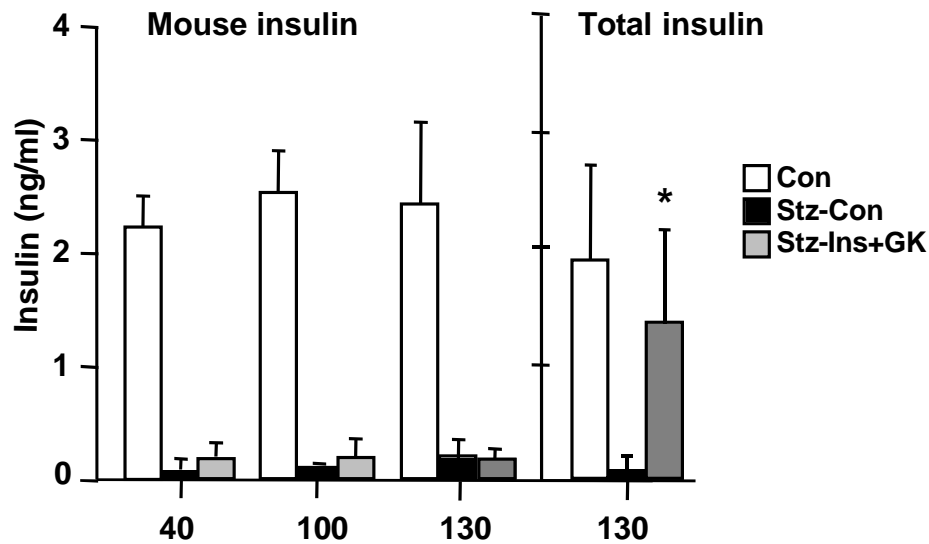


Figura 12. Nivells d'insulina murina i nivells d'insulina total en sèrum. Als dies indicats després de la injecció d'Stz es va analitzar per ELISA i per RIA la insulina circulant dels diferents grups d'animals: animals controls sans (Con), control diabètics (Stz-Con) i diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK. Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 8 ratolins per grup. * $p < 0,05$ vs Stz-Con.

Un cop es processa la insulina humana mutada transferida pel vector AAV1, s'hauria d'alliberar en sang el pèptid C humà si es produeix un processament correcte de la insulina per part del múscul esquelètic. Al determinar la concentració de pèptid C humà, es va observar que tant els ratolins control sans com els ratolins diabètics no presenten nivells del pèptid en sèrum (Figura 13). En canvi, els ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK presentaven nivells elevats de pèptid C. Això indica que la insulina humana era processada correctament pel múscul esquelètic i el pèptid C humà s'alliberava al torrent sanguini.

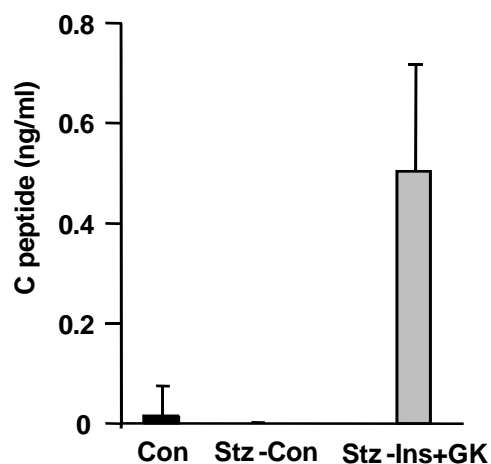


Figura 13. Nivells de pèptid C humà en sèrum. Als 4 mesos després del tractament amb Stz es va analitzar per RIA els nivells de pèptid C humà en sang de ratolins control sans (Con) de ratolins control diabètics (Stz-Con), i dels ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK (Stz-Ins+GK). Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 4 ratolins per grup. * $p < 0,05$ vs Stz-Con.

Per tal de confirmar l'absència de producció d'insulina pel pàncrees dels ratolins es va determinar el contingut d'insulina pancreàtica en els diferents grups d'animals. Tots els ratolins tractats amb Stz presentaven una reducció del 90% del contingut pancreàtic d'insulina (Figura 14A). A més a més, les cèl·lules β productores d'insulina eren difícilment detectades en els illots pancreàtics després d'un anàlisi immunohistoquímic, específic per la insulina, en seccions de pàncrees (Figura 14B).

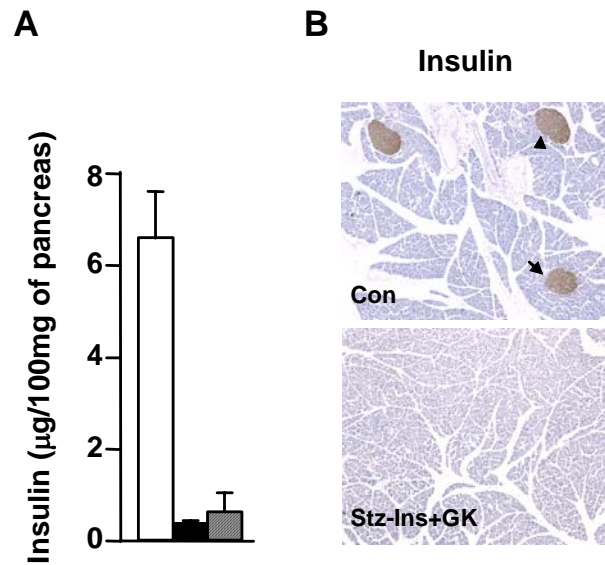


Figura 14. Contingut pancreàtic d'insulina (A) i anàlisi immunohistoquímic dels pàncrees (B). (A) Es va determinar mitjançant RIA el contingut d'insulina d'un homogenat de pàncrees, tal i com s'indica als Materials i Mètodes, dels ratolins control sans (Con), els ratolins control diabètics (Stz-Con) i els ratolins diabètics tractats amb AAV-Ins+GK (Stz-Ins+GK). Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 4 ratolins per grup. * $p < 0,05$ vs Stz-Con. (B) Anàlisi immunohistoquímic de la presència d'insulina en talls histològics de pàncrees de ratolins control sans i de ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK (Stz-Ins+GK) 4 mesos després del tractament amb Stz.

3.4. Efecte de la insulina i de la GK sobre l'expressió de gens claus en el metabolisme.

3.4.1. Expressió d'insulina i de glucoquinasa a múscul esquelètic.

En primer lloc, es va analitzar el nivell d'expressió dels gens de la insulina i la GK en múscul esquelètic 4 mesos després del tractament amb Stz. L'RNA total es va analitzar mitjançant Northern blot i es va hibridar amb una sonda específica per insulina i una altra per GK. Es va observar que el múscul esquelètic dels ratolins transduïts expressaven nivells alts d'ambdós gens

(Figura 15). Això indicava que s'assolia un gran nivell d'expressió d'insulina i de GK a molt llarg termini.

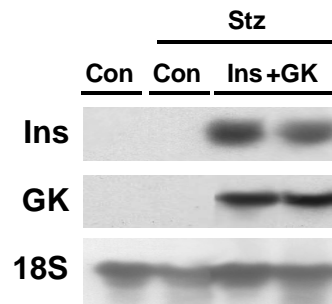


Figura 15. Expressió d'insulina i de GK en els músculs esquelètics tractats amb AAV1-Ins+GK. Es va determinar mitjançant l'anàlisi per *Northern blot* del RNA total del múscul esquelètic l'expressió d'insulina i de GK de ratolins control normals (Con), de ratolins diabètics control (Stz-Con) i tractats amb els vectors AAV1-Ins+GK (Stz-Ins+GK). Es presenta un *Northern blot* representatiu hibridat amb les sondes de cDNA específiques.

3.4.2. Expressió de GLUT4 a múscul esquelètic.

A continuació, es va analitzar l'expressió de GLUT4 a múscul dels animals diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK. Al cap de 4 mesos de la inducció de la diabetis, el contingut de GLUT4 havia disminuït en els ratolins control, mentre que en el cas dels ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK els nivells observats eren similars als dels ratolins control normal sans (Figura 16). Aquests resultats indicaven que la producció d'insulina a nivell local tenia un efecte autocrí/paracrí i que mantenia l'expressió del transportador de la glucosa a múscul esquelètic.

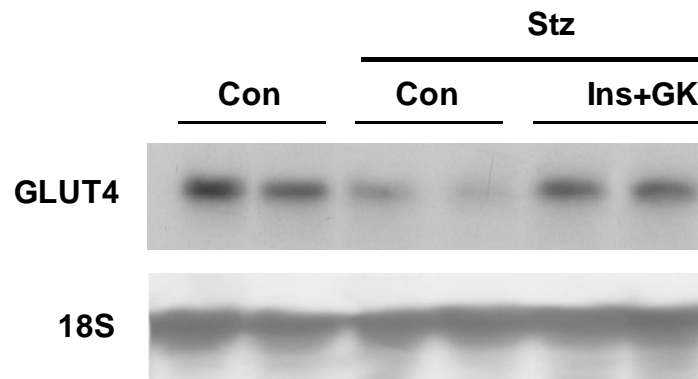


Figura 16. Expressió de GLUT 4 a múscul esquelètic. Als 4 mesos després del tractament amb Stz es va analitzar per Northern blot els nivells d'expressió de GLUT4 dels diferents grups: control sans (Con), control diabètic (Stz-Con), i diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK (Stz-Ins+GK). Es presenta un *Northern blot* representatiu hibridat amb la sonda específica per GLUT4.

3.4.3. Expressió de la fosfo-enolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) a fetge.

Durant la diabetis, l'increment de la relació glucagó/insulina dóna lloc a un augment de l'activitat de la via gluconeogènica a fetge. L'enzim PEPCK és l'enzim principal regulador d'aquesta via, i la seva expressió incrementa durant la diabetis.

Amb l'objectiu de determinar si la insulina produïda pel múscul en aquests animals era capaç de revertir l'expressió de PEPCK, a fetge es van determinar els nivells d'expressió d'aquest enzim en els diferents grups d'animals. Així, es va observar que l'expressió del gen de la PEPCK estava augmentada en animals control diabètics (Figura 17). En canvi, la presència d'insulina circulant, degut a la producció per part del múscul esquelètic, provocava una disminució en l'expressió del gen de la PEPCK al fetge de ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK, la qual assolia nivells similars als controls sans (Figura. 17). Així

doncs, la normalització de la PEPCK disminuiria la producció hepàtica de glucosa i per tant, també contribuiria a normalitzar la glucèmia en els animals tractats.

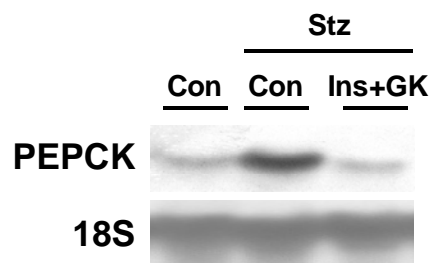


Figura 17. Expressió de PEPCK a fetge. Es va determinar mitjançant l'anàlisi per *Northern blot* de RNA total de fetge l'expressió de l'enzim PEPCK en els ratolins control, ratolins diabètics control i tractats amb AAV1-Ins+GK. Es presenta un *Northern blot* representatiu hibridat amb la sonda de cDNA específica per a PEPCK.

3.5. Test de tolerància a la glucosa i secreció d'insulina pancreàtica.

Amb l'objectiu d'estudiar la resposta dels ratolins diabètics tractats amb insulina i amb GK a una sobrecàrrega de glucosa *in vivo*, es va realitzar un test de tolerància a la glucosa, 3 mesos després del tractament amb Stz.

Per això, es va injectar intraperitonealment 1g de glucosa/kg a un grup d'animals sans, un grup de ratolins control diabètics i el grup diabètic tractat amb AAV-Ins+GK després d'un dejú de 16h. En el moment inicial, abans d'injectar el bolus de glucosa, els ratolins control diabètic presentaven una elevada hiperglucèmia, mentre que en els ratolins diabètics tractats amb Ins+GK i els ratolins controls sans eren normoglucèmics (Figura 18). A partir dels 15 minuts de l'administració de glucosa es va observar un increment en la glucèmia de tots els grups. No obstant, els increments observats en els ratolins

control diabètic van ser molt superiors als assolits en els ratolins sans i els tractats amb Ins+GK. A més, es va observar que tant els ratolins control sans com en els ratolins diabètics tractats amb Ins+GK recuperaven al cap d'una hora els nivells basals de glucosa i presentaven una glucèmia similar durant tot el test (Figura 18). Per contra, el grup control diabètic no van recuperar la normoglucèmia en cap moment de l'experiment. Aquests resultats suggerien que l'expressió d'insulina i de GK per part del múscul esquelètic era capaç de contrarestar la sobrecàrrega de glucosa molt probablement incrementant la captació de glucosa pel múscul esquelètic.

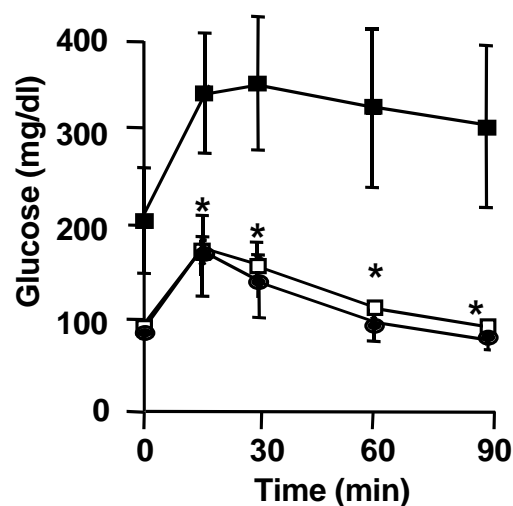


Figura 18. Test de tolerància a la glucosa. Ratolins controls sans (□), ratolins diabètic control (■), i tractats amb AAV-Ins+GK (●) van ser dejunats i se'ls va injectar intraperitonealment un bolus d'1 mg/g de pes al temps 0. Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 4 ratolins per grup. * $p < 0,05$ vs STZ-Con.

Tot i que ja s'havia observat la manca d'illots pancreàtics i d'insulina pancreàtica (Figura 14A,B), en els ratolins diabètics es va determinar també una possible capacitat de secretar insulina per les cèl·lules β romanents al pàncrees en resposta a una elevada concentració de glucosa. Així, 3 mesos després del tractament amb Stz, els ratolins diabètics es van dejunar 16 hores i

se'ls va injectar intraperitoneal amb una dosi molt més elevada de glucosa (3 g/kg pes). A continuació, es van extreure alíquotes de sang a temps curts i es van analitzar els nivells d'insulina de ratolí en sèrum al llarg del temps. La concentració d'insulina de ratolí dels animals tractats amb Stz estava totalment disminuïda, tant el grup no tractat com el grup tractat amb AAV-Ins+GK (Figura 19).

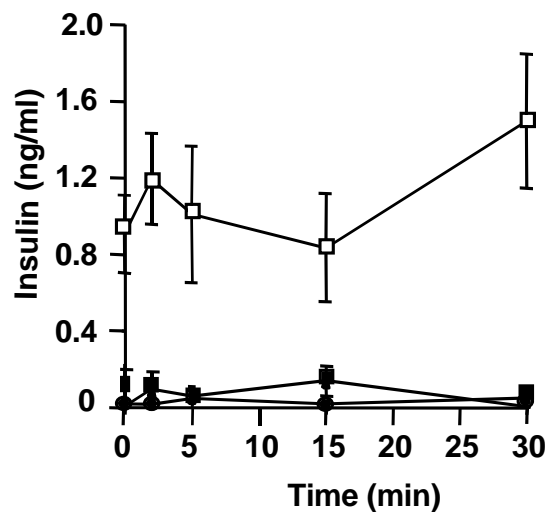


Figura 19. Test de secreció pancreàtica d'insulina. Ratolins controls sans (□), ratolins diabètics control (■), i tractats amb AAV-Ins+GK (●) es van dejunar i sotmetre a un bolus intraperitoneal de glucosa a una dosi de 3 g/kg. A diferents temps van extreure sèrums a partir de la sang de la via caudal. Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 4 ratolins per grup. * $p < 0,05$ vs STZ-Con.

Aquests resultats indicaven que les cèl·lules productores d'insulina del pàncrees dels ratolins tractats amb Stz havien estat totalment destruïdes i no eren funcionals, ja que no eren capaces de secretar insulina murina en resposta a una elevada sobrecàrrega de glucosa. A més, això confirmava que la millora en la tolerància a la glucosa en els ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK era el resultat de l'expressió dels gens de la insulina i de la GK.

1.1. Evolució del consum de menjar i d'aigua.

També, es van mesurar el consum d'aigua i menjar en els diferents grups d'animals. Es va observar que els ratolins tractats amb Stz manifestaven una clara polidípsia, ja que presentaven un consum d'aigua 9 vegades superior al dels ratolins controls sans (Figura 20A). En canvi, el grup tractat amb AAV1-Ins+GK, presentava una normalització del consum de líquid. Paral·lelament, pel que fa al consum de menjar, el grup diabètic control presentava un gran increment de més de 5 vegades respecte al control normal (Figura 20B). En canvi, el grup tractat amb AAV1-Ins+GK presentava un consum de menjar similar al del grup control sa. Per tant, la producció d'insulina i de GK a múscul esquelètic normalitzava la polidípsia i la polifàgia característiques de l'estat diabètic.

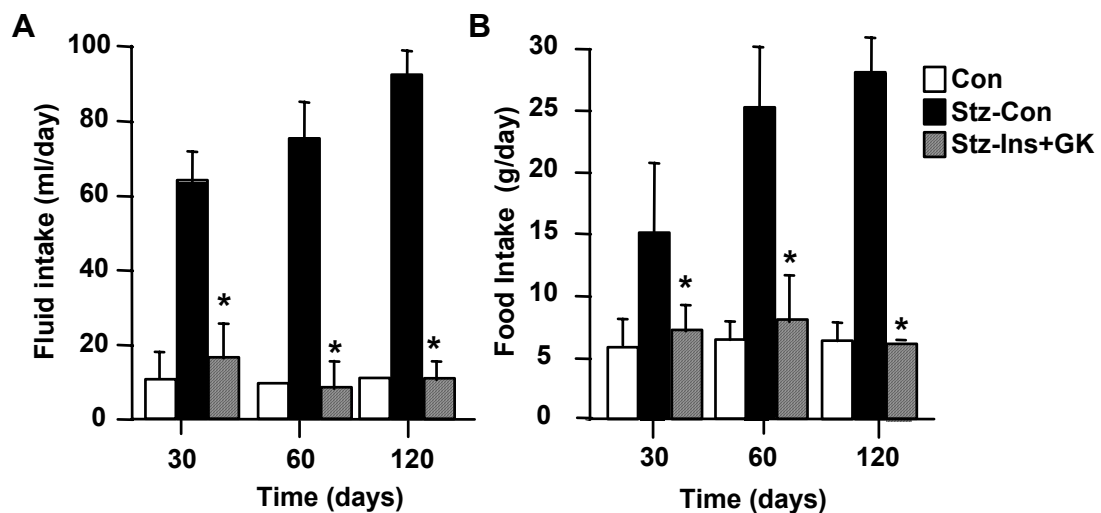


Figura 20. Evolució del consum d'aigua (A) i de menjar (B). Evolució del consum d'aigua (A) i evolució del consum de menjar (B) en el grup de ratolins control (Con), el grup de ratolins diabètics control (Stz-Con) i el grup tractat amb AAV-Ins+GK (Stz-Ins+GK). Els resultats són la mitja \pm SEM de 10 animals per grup. (*) $p < 0.05$. vs Stz-Con.

1.2. Efecte de l'expressió d'insulina i de GK sobre la massa muscular.

Donat que la manca d'insulina indueix un procés de proteòlisi a nivell del múscul esquelètic, 4 mesos després del tractament amb STZ, es va estudiar si l'expressió d'insulina i de GK podia revertir aquesta pèrdua de massa muscular. Així, es va determinar el pes dels tres músculs tractats amb vectors AAV1 (*tibialis cranealis*, *gastrocnemius* i *quàdriceps*). També es va mesurar el pes del teixit adipós abdominal, ja que la disminució de la insulina circulant porta a un increment en la lipòlisi. Els ratolins control diabètic havien perdut una elevada quantitat de massa muscular (al voltant d'un 30%) i la major part de teixit adipós abdominal (al voltant del 70%) (Figura 21). En canvi, els ratolins diabètics tractats amb Ins+GK presentaven una massa muscular i de teixit adipós similar als controls sans (Figura 21). Això indicava que la insulina produïda pel múscul esquelètic bloquejava la proteòlisi en el múscul i la lipòlisi en el teixit adipós.

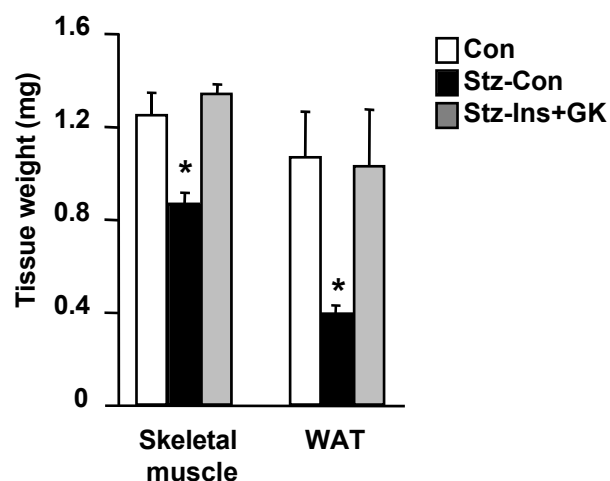


Figura 21. Pes del teixit muscular i del teixit adipós. Als 4 mesos després del tractament amb Stz es va determinar el pes de teixit muscular i el pes del teixit adipós abdominal en animals control (Con), animals diabètics control (Stz-Con) i tractats amb AAV-Ins+GK (Stz-Ins+GK). WAT, teixit adipós blanc. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 7 animals per grup. * $P < 0.05$ vs. control sa.

1.3. Disminució de les complicacions secundàries.

La hiperglucèmia diabètica es la responsable del desenvolupament de les complicacions secundàries a llarg termini. S'han descrit en pacients diabètics problemes gastrointestinals deguts a alteracions en el funcionament del sistema nerviós entèric, que es tradueixen en maldigestió, diarrea i dilatació gastrointestinal. Així, els ratolins diabètics no tractats presentaven una marcada distensió gàstrica, de l'intestí prim i gruixut i del cec. A més, presentaven una absència de teixit adipós abdominal (Figura 22). En canvi, es va observar que l'aparença dels òrgans abdominals dels ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK era similar a la dels controls sans.

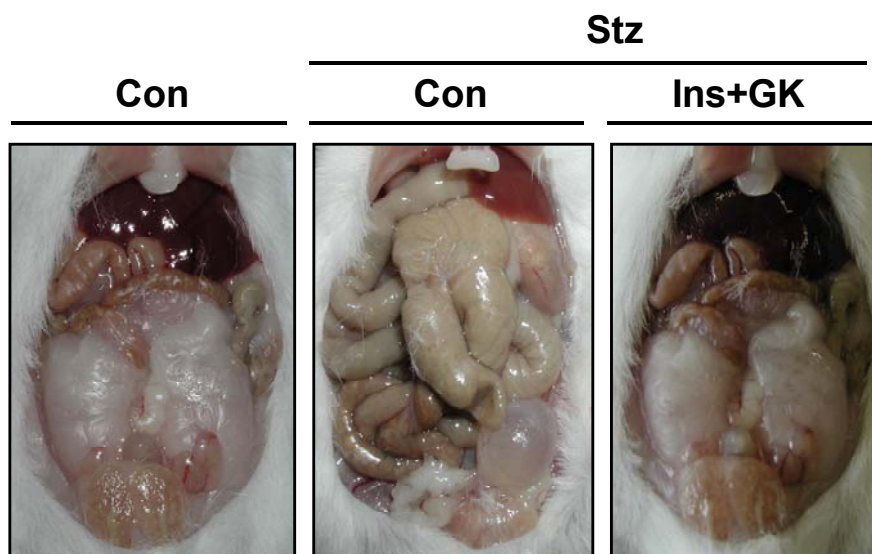


Figura 22. Aparença dels òrgans abdominals. Es va determinar l'aparença abdominal dels diferents òrgans dels ratolins control (Con), dels ratolins diabètics (Stz-Con) i dels ratolins tractats amb AAV-Ins+GK amb una dosi de $3,6 \times 10^{10}$ vg (Stz-Ins+GK) 4 mesos després del tractament amb Stz.

Una complicació secundària de la diabetis molt freqüent és la neuropatia perifèrica. Per tant, es va examinar el grau d'innervació sensitiu i autònom en els coixinets plantars dels ratolins. Per això, es van realitzar talls seriatos dels coixinets plantars de les extremitats posteriors i es va determinar, mitjançant anàlisi immunohistoquímica contra la proteïna PGP9.5 (marcador pan-neuronal), la presència de terminacions nervioses a nivell epidèrmic i de la glàndula sudorípara. Els ratolins control diabètic presentaven una notable pèrdua de terminacions nervioses intraepidèrmiques així com una pèrdua de fibres en el plexe subepidèrmic (Figura 23). A la glàndula sudorípara s'observa una lleugera disminució en el marcatge de fibres. En canvi, els ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK presentaven una normalització de la quantitat fibres nervioses (Figura 23). Això indicava que el manteniment de la normoglucèmia a llarg termini prevenia el desenvolupament de neuropatia diabètica en els ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK.

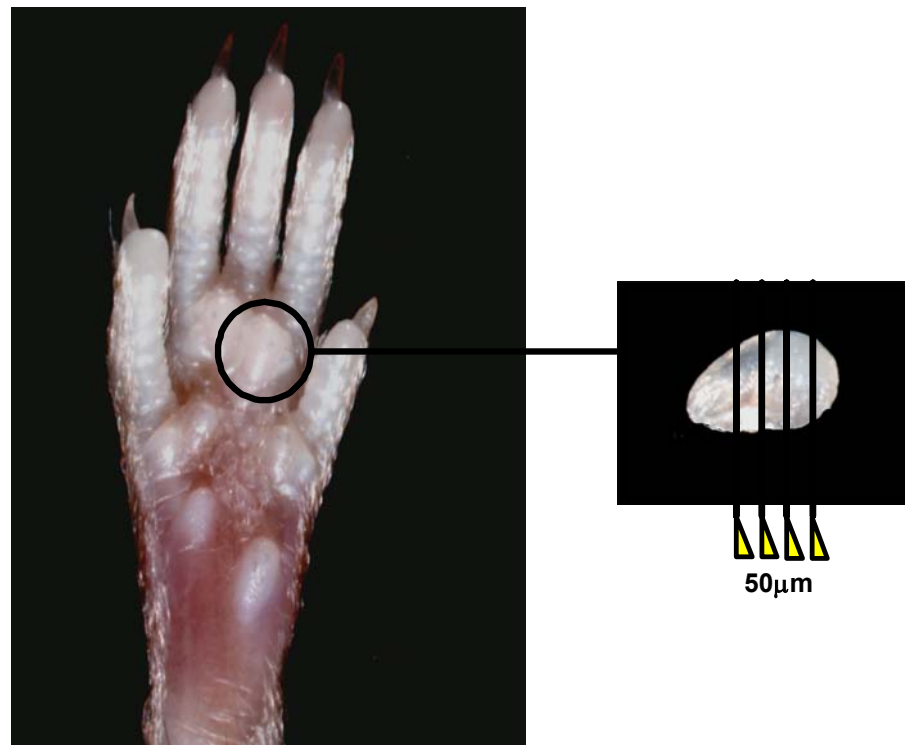


Figura 23. Anàlisi immunohistoquímic dels coixinets plantars i glàndula sudorípara. Als 4 mesos després del tractament amb Stz, es va realitzar un anàlisi immunohistoquímic de terminacions nervioses, utilitzant un anticòs antiPGP9.5, als coixinets plantars dels ratolins control, ratolins diabètics control (Stz-Con) i tractats amb AAV1-Ins+GK (Stz-Ins+GK). Augments originals 20X.

Així, aquest estudi demostrava l'efectivitat d'una nova estratègia de teràpia gènica a llarg termini mitjançant la generació d'un sensor de la glucosa amb la injecció de vectors AAV1-Ins+GK a múscul esquelètic, per contrarestar la diabetis de tipus 1 en ratolí. No obstant, abans que aquesta teràpia es pugui emprar en pacients cal fer estudis en grans animals.

2. TRANSFERÈNCIA DE GENS A MÚSCUL ESQUELÈTIC DE GOS MITJANÇANT VECTORS AAV1

La injecció directa d'AAV-1 en el múscul esquelètic ha demostrat ser una tècnica molt eficient en models de rosegadors. No obstant, i donada la petita mida d'aquest model animal, es fa necessari optimitzar noves condicions experimentals a l'hora de treballar amb animals més grans. Per aquest motiu, en el present estudi, es va escollir l'espècie canina com a model per a determinar l'eficàcia de la transferència gènica a múscul esquelètic com a pas previ a una possible teràpia en pacients diabètics.

2.1. Transferència d'AAV1-GFP a múscul esquelètic de gos mitjançant injecció intramuscular.

En primer lloc, es va injectar intramuscularment un vector AAV1 que contenia el gen de la GFP sota el control del promotor constitutiu del citomegalovirus (CMV-GFP) a un gos sa. L'elecció de la dosi del vector es va determinar en funció de la dosi idònia pel ratolí (1×10^{12} vg/kg ratolí). Així doncs, es va fer servir la mateixa quantitat de vector viral, per kg de pes, per tractar el gos. No obstant, aquesta dosi total es va dividir en dosis més petites de 5×10^{11} vg i es va incrementar el nombre de punts d'injecció, que es varen distribuir al llarg de la fibra muscular. Per a l'administració dels vectors es va procedir a l'anestèsia dels animals. Per a tal efecte, es va utilitzar una premedicació amb buprenorfina intramuscular (0,01 mg/kg). Posteriorment, es va realitzar la inducció de l'anestèsia amb Propofol (4 mg/kg) i un manteniment de la mateixa

amb isofluorà. Un cop el gos havia sigut anestesiàt es va procedir a la realització de múltiples injeccions al *tibialis cronealis*. Cada punt d'injecció, de 0.5 ml, contenia una solució salina amb 5×10^{11} vg de AAV1-GFP. Finalitzades les injeccions es va permetre que l'animal es recuperés. En tots els casos la recuperació post-injecció va ser molt favorable, permetent que els animals fossin retornats al seu estabulari, indicant que aquesta estratègia d'administració no es gens agressiva per l'animal.

Al cap de 7 dies de la injecció del vector viral, el gos va ser eutanasiat amb una injecció intravenosa de tiopental sòdic. Un cop eutanasiat es va procedir a la presa de mostres de diferents zones del *tibialis cronealis* transduït amb AAV1-GFP. Una part del múscul es va congelar per a l'anàlisi d'RNA i l'altra part es va fixar en formol al 4% i es va incloure en parafina per la posterior anàlisi immunohistoquímica de la proteïna GFP. En primer lloc, mitjançant una RT-PCR específica es varen detectar nivells elevats d'expressió de GFP en el múscul esquelètic injectat amb els vectors AAV1 (Figura 24).

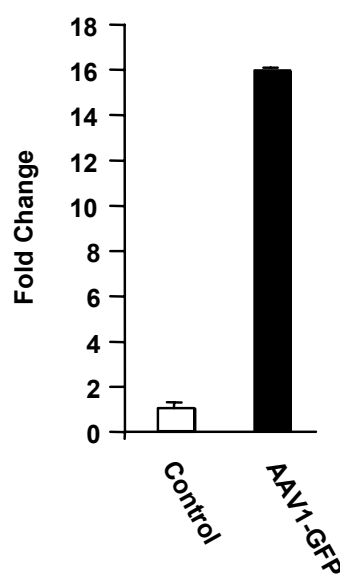


Figura 24. Expressió de GFP al múscul caní injectat amb AAV1-GFP. Es va determinar mitjançant RT-PCR l'expressió de GFP d'un *tibialis cronealis* de la extremitat contralateral (Con) i d'un injectat amb AAV1-GFP (5×10^{11} vg/ml).

En realitzar una anàlisi immunohistoquímica contra la proteïna GFP es va observar, tant en seccions transversals com longitudinals, que al voltant del 60% de les fibres musculars expressaven el gen marcador (Figura 25). La proteïna GFP s'observava dispersa al llarg de tota la fibra i no s'observava cap tipus de fluorescència als músculs no tractats (Figura 25).

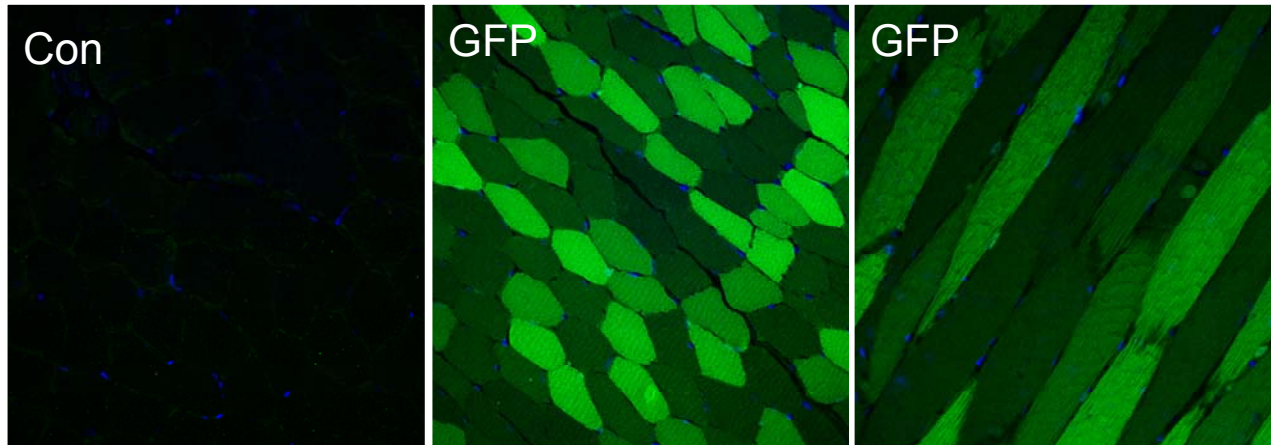


Figura 25. Anàlisi histològica del *tibialis crancealis* caní transfectat amb AAV1-GFP. Set dies després de la injecció dels AAV1, el múscul control i el tractat amb AAV1-GFP (5×10^{11} vg/punt) van ser extrets i fixats en formalina i analitzats mitjançant immunohistoquímica amb anticòs anti- GFP. L'expressió de GFP va ser analitzada en seccions transversals i longitudinals amb microscopi de fluorescència. Augments originals 40x.

Per tal de fer un seguiment dels gossos injectats amb AAV en la musculatura esquelètica es varen determinar en sèrum paràmetres bioquímics marcadors de l'estat general de l'animal: nivells iònics de sodi, potassi, clorurs, calci i fosfats, glucèmia, proteïnes totals, bilirubina total i colesterol. A més, també es varen determinar els nivells sèrics d'enzims marcadors de dany hepàtic, com l'alanina aminotransferasa (ALT) i l'aspartat aminotransferasa (AST), i marcadors de dany muscular com la creatina quinasa (CK). També, es va realitzar una anàlisi hematològica complerta. Es va observar que tots els paràmetres analitzats es mantenien en el rang de la normalitat, indicant que la tècnica utilitzada no presentava riscos de dany muscular ni hepàtic.

Així doncs, aquests resultats demostraven que l'AAV1 podia transduir eficientment, i de manera segura, el múscul esquelètic caní de manera similar al que havíem observat en ratolins.

3. APROXIMACIONS DE TERÀPIA GÈNICA EN GOSSOS DIABÈTICS MITJANÇANT L'EXPRESSION D'INSULINA.

Els estudis presentats anteriorment en ratolí han demostrat que l'expressió basal d'insulina a llarg termini per part del múscul esquelètic podia contrarestar la hiperglucèmia en dejú i millorar l'estat general de l'animal. Per tal d'establir si es podien assolir uns efectes similars en gossos diabètics vàrem estudiar les condicions necessàries per adaptar aquesta estratègia terapèutica a aquests animals. Així doncs, es va determinar si la producció constitutiva d'insulina per part del múscul esquelètic era capaç de contrarestar la hiperglucèmia diabètica en un model caní.

3.1. Inducció de diabetis experimental en un gos i anàlisi de la glucèmia en dejú.

Així doncs, a un gos de 4 mesos d'edat se li va induir la diabetis experimental mitjançant la injecció d'una barreja de 35 mg/kg d'Stz i 40 mg/kg d'Alloxan. Durant les primeres hores després d'aquesta injecció, el gos experimentà una severa hipoglucèmia degut a l'elevada quantitat d'insulina alliberada al destruir-ne les cèl·lules β . Per això, el gos va ser monitoritzat en tot moment. Durant aquest període se li va administrar fluids suplementats amb una solució de glucosa per tal de contrarestar aquesta hipoglucèmia. Posteriorment, a les 24 hores, la glucèmia va anar incrementant fins a arribar a nivells hiperglucèmics (Figura 26). Quan el gos tractat amb Stz-Alloxan va mantenir tres dies

consecutius una glucèmia superior a 250 mg/dl es va considerar diabètic i es va començar el tractament amb AAV1-Ins.

Així, els músculs *tibialis cranealis*, *gastrocnemius* i *quadriceps* d'ambdues cames es van transduïr amb un vector AAV1-Ins. Per tal d'assolir una elevada distribució del vector a través de la fibra muscular, es varen realitzar al voltant de 50 injeccions, amb una dosi de 5×10^{11} vg/injecció i un volum de 0.5 ml per injecció, utilitzant un sistema multiinjector de 5 agulles a les dues cames del darrere (Figura 26). La dosi total administrada va ser de 2.5×10^{12} vg/kg, més elevada que la dosi usada en ratolí, per tal d'assegurar nivells molt elevats d'insulina circulant.



Figura 26. Injecció d'AAV1 a múscul esquelètic de gos. Es varen realitzar 50 injeccions (5×10^{11} vg/0.5 ml mitjançant un multiinjector de 5 agulles als músculs *tibialis cranealis*, *gastrocnemius* i *quadriceps* de les extremitats posteriors.

Immediatament abans de les injeccions intramusculars d'AAV1-Ins, el gos presentava un nivell de glucosa en sang al voltant de 350 mg/dl. En les 24 hores posteriors a l'administració d'AAV1-Ins, la glucèmia en dejú es va normalitzar totalment (Figura 27). Això indicava que la insulina produïda pel

múscul esquelètic era capaç de revertir la hiperglucèmia característica de la diabetis en un estat de dejuni.

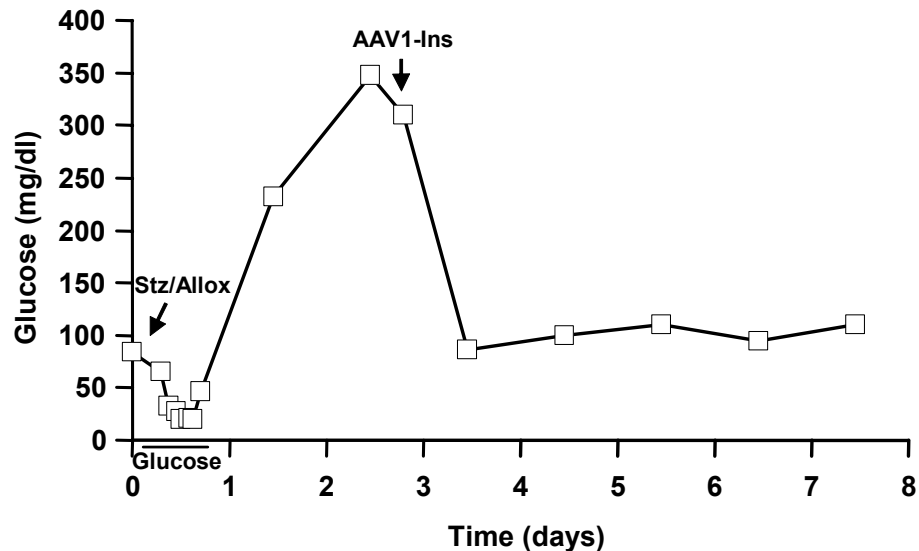


Figura 27. Evolució al llarg del temps dels nivells de glucosa en dejú en un gos diabètic tractat amb AAV1-Ins. Les glucèmies varen ser determinades cada matí en dejú abans del tractament amb Stz-Alloxan i fins a 8 dies després. L'animal va rebre una dosi de 2.5×10^{12} vg/kg d'AAV1-Ins 3 dies després d'administrar-li la barreja d'Stz-Alloxan.

3.2. Test de tolerància oral a la glucosa.

Amb l'objectiu de determinar la resposta del gos a una sobrecàrrega de glucosa, es va realitzar un test oral de tolerància a la glucosa amb una dosi de 3 g/Kg de glucosa. El test es va efectuar en 3 moments diferents al llarg de l'experiment. En primer lloc, quan l'animal era completament sa, abans de l'administració d'Stz-Alloxan (estat normal) (Figura 28). Posteriorment, es va realitzar aquest test quan l'animal era marcadament hiperglucèmic, tres dies després del tractament amb Stz-Alloxan (estat diabètic). Finalment, es va

avaluar l'efecte del tractament amb AAV1-Ins en la tolerància al sucre 8 dies després de la inducció de diabetis amb Stz-Alloxan (estat diabètic tractat).

Així, es va observar que tres dies després de la injecció d'Stz-Alloxan, abans de l'administració d'AAV1-Ins, la glucèmia en dejú, prèvia al bolus de 3 g/kg de glucosa per via oral, era la característica d'un estat diabètic, és a dir, marcadament hiperglucèmica. En canvi, quan el gos es trobava en un estat sa i també després del tractament amb AAV1-Ins, els valors inicials de glucosa abans del bolus eren normoglucèmics (Figura 28). A partir dels 30 minuts de l'administració del bolus de glucosa, es va observar un increment en la glucèmia en tots 3 estats. No obstant, l'increment observat en l'estat diabètic era molt més elevat, i fins i tot van arribar a ser superiors als nivells de detecció de l'aparell (≥ 600 mg/dl). En canvi, la glucèmia del gos sa i del gos tractat amb AAV1-Ins només diferien en un 15% entre ells (Figura 28). Aquesta diferència es mantenia fins als 150 min després de la sobrecàrrega de glucosa. A partir d'aquest moment, el gos tractat amb AAV1-Ins normalitzava totalment els nivells de glucosa. Per contra, el gos en estat diabètic no va recuperar la normoglucèmia en cap moment de l'experiment (Figura 28).

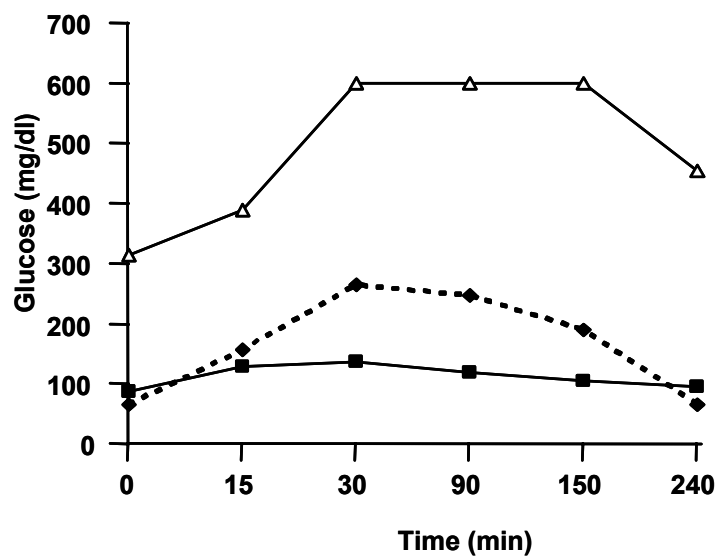


Figura 28. Test de tolerància oral a la glucosa. Es va realitzar un test de tolerància oral a la glucosa (3g/kg) al mateix animal en tres estats diferents. A l'animal sa (■), a l'animal quan era diabètic (Δ), i al tractat amb AAV1-Ins (◆). Les glucèmies varen ser determinades mitjançant extraccions de sang per la vena cefàlica de l'extremitat anterior, tal i com s'indica a Materials i Mètodes.

Aquests resultats suggerien que l'expressió d'insulina per part del múscul esquelètic era determinant per contrarestar la sobrecàrrega de glucosa. Tot i així, l'expressió d'insulina pel múscul esquelètic no era capaç de mimetitzar exactament l'evolució de la glucèmia del control sa.

3.3. Expressió d'insulina pel múscul esquelètic.

Per tal de comprovar que l'efecte observat en la glucèmia després de la injecció d'AAV1-Ins era degut a la insulina muscular es va analitzar l'expressió d'insulina a múscul esquelètic a diferents músculs del membre pelvià. Deu dies després del tractament amb Stz-Alloxan es va eutanasiar el gos i es van extreure mostres dels músculs *tibialis cranealis*, *gastrocnemius* i *quadriceps*. A

més a més, es va agafar una mostra del múscul *tricipital* de l'extremitat anterior com a control no transduït. A continuació, es va obtenir l'RNA total de tots els músculs i es va analitzar mitjançant Northern blot. Posteriorment s'hibridava amb una sonda que contenia el cDNA de la insulina. Així doncs, s'observava expressió del gen en totes les mostres analitzades de l'extremitat transduïda amb AAV1-Ins (Figura 29). La diferència d'expressió molt probablement era deguda a la diferència de difusió del vector viral a través del múscul esquelètic.

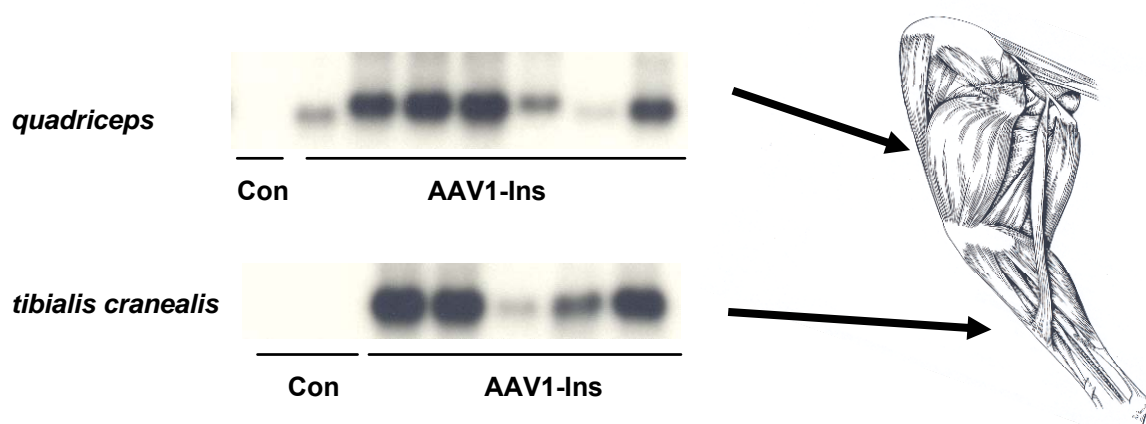


Figura 29. Expressió d'Insulina múscul esquelètic. Als 7 dies després del tractament amb AAV1-Ins es van analitzar per Northern blot els nivells d'expressió d'insulina en mostres a l'atzar en músculs transfectats (*quadriceps* i *tibialis cranealis*) i en els músculs control (*tricipital*). Es presenta un *Northern blot* representatiu hibridat amb la sonda de cDNA específica per Insulina.

3.4. Determinació dels nivells d'insulina i de peptid C en sèrum.

Diferents dies després del tractament amb Stz-Alloxan es van mesurar per RIA els nivells totals d'insulina sèrica (canina mes humana) i de peptid C humà.

Tres dies després del tractament amb Stz-Alloxan, els nivells d'insulina total sèrica del gos eren molt inferiors als nivells observats en el mateix gos en estat sa (Figura 30A). Això indicava que el tractament amb la droga havia destruït

gran part de les cèl·lules β del pàncrees. Cinc dies després de la injecció del vector AAV1-Ins a múscul esquelètic, els valors de l'hormona en sang incrementaven notablement i mostraven valors similars als sans (Figura 30A).

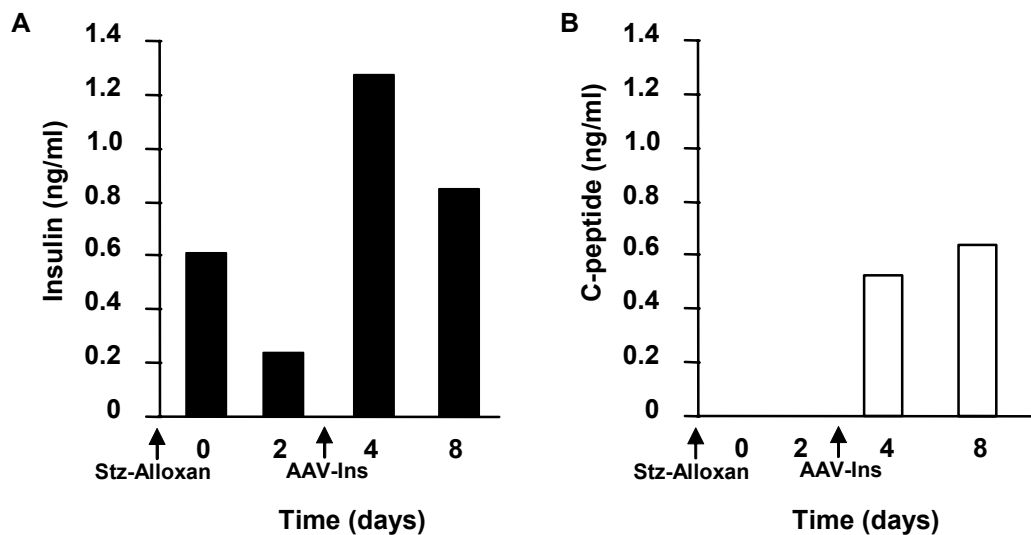


Figura 30. Nivells d'insulina total (A) i de pèptid C humà (B) en sèrum caní. El dia de la injecció d'Stz-Alloxan, així com 2, 4 i 8 dies després, es va extreure sèrum i es va analitzar per RIA la insulina total (■) i els nivells de pèptid C (□) circulant en el gos.

Paral·lelament, per tal de determinar que la insulina detectada fos la insulina humana produïda pel múscul esquelètic es va analitzar la presència de pèptid C humà al sèrum caní. Així, es va observar que els valors de pèptid C en el sèrum de l'animal abans del tractament amb AAV-1 no eren detectables (Figura 30B). Per contra, després del tractament amb AAV1-Ins s'observava un increment dels nivells de pèptid C a sèrum. Això indicava que la insulina humana s'havia processat correctament en el múscul del gos i que l'increment en la insulina total observat anteriorment era probablement degut a la producció d'insulina humana pel múscul esquelètic (Figura 30B). No obstant, molt probablement, part de la insulina humana detectada estaria en forma de proinsulina.

Per descartar el possible paper de la insulina d'origen pancreàtic del gos en el manteniment de la normoglicèmia, es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica en talls histològics de pàncrees per tal de detectar la presència de cèl·lules β productores d'insulina. A diferència del pàncrees de ratolí, el pàncrees caní conté un gran número de petits illots pancreàtics homogeniament distribuïts. A l'analitzar immunohistoquímicament el pàncrees del gos sa es va evidenciar la presència dels petits illots característics (Figura 31). En canvi, en el gos diabètic tractat amb AAV1-Ins, les cèl·lules β del pàncrees eren difícils de detectar (Figura 31). Aquests resultats indicaven que el pàncrees del gos diabètic presentava una dràstica destrucció de cèl·lules β productores d'insulina degut al tractament amb Stz-Alloxan, i que per tant, probablement, no era capaç de secretar insulina al torrent sanguini.

3.5. Estudi de paràmetres sèrics.

Donat que el gos diabètic tractat amb AAV1-Ins presentava una normalització de la glucèmia en dejú, un increment en la insulinèmia, i una millora de la tolerància a la glucosa, es va realitzar una anàlisi bioquímica dels principals paràmetres sèrics, com els nivells de bilirrubina total, calci, colesterol, creatinina, fòsfor, triglicèrids, urea, sodi, potassi, clorur, lactat, ALT, AST, creatinina quinasa i fosfatasa alcalina. Es va observar que tots els paràmetres analitzats presentaven uns valors de normalitat. El proteïnograma d'aquest animal també presentava uns valors de normalitat. Aquests resultats suggerien que la producció d'insulina per part del múscul esquelètic del gos permetia

restablir el metabolisme general de l'animal, la qual cosa evitava l'aparició d'alteracions en els nivells sèrics de triglicèrids i altres paràmetres associats al desenvolupament de la diabetis.

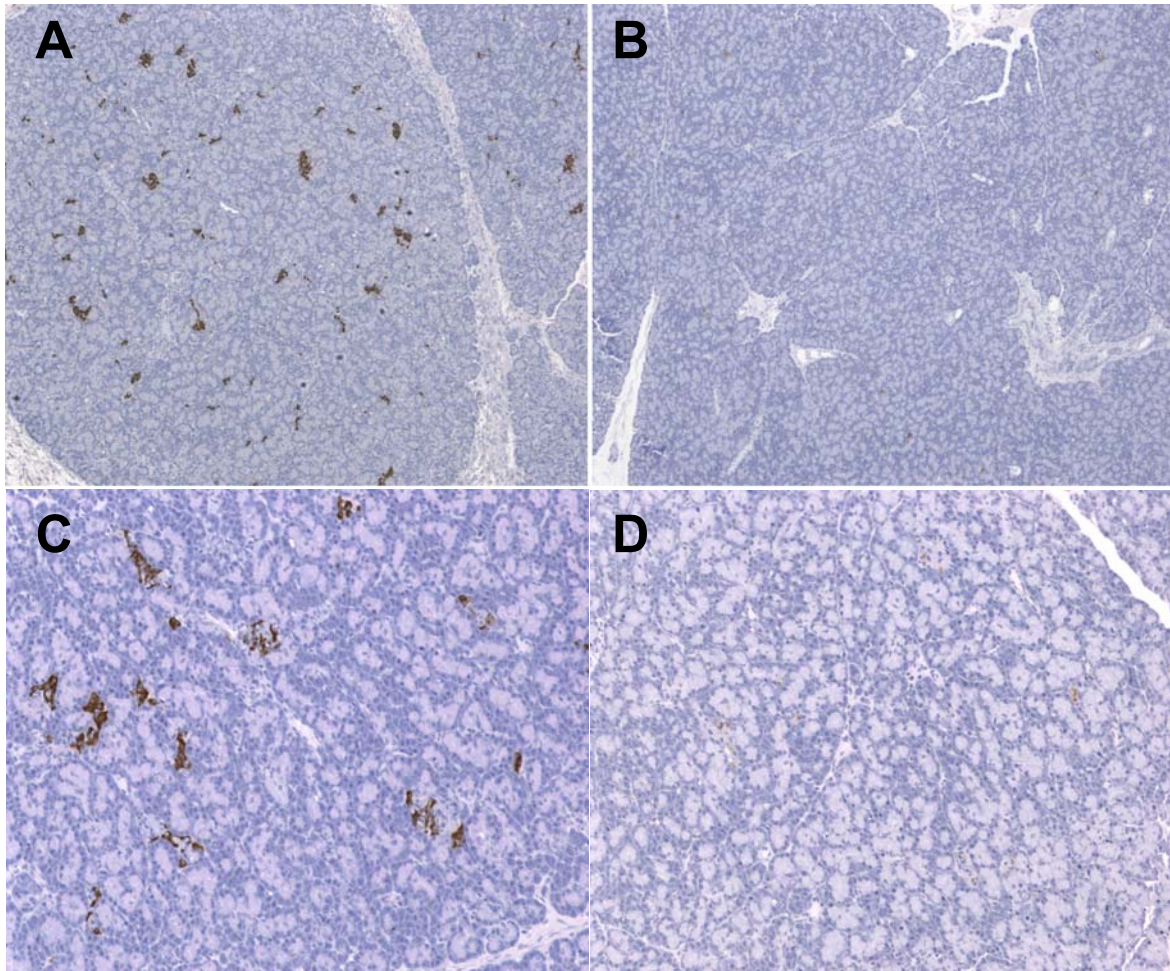


Figura 31. Anàlisi immunohistoquímica de la presència de cèl.lules β en el pàncrees de gos. Es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica contra insulina del pàncrees d'un gos sa (A,C) i del gos diabètic tractat amb AAV1-Ins (B,D). La reducció de la massa de cèl.lules productores d'insulina és evident en el gos tractat amb STZ-alloxan+ AAV1-Ins. Augments originals 4x (A,B) i 10x (C,D).

Per tant, en aquesta part de l'estudi s'ha evaluat una possible estratègia terapèutica per a la diabetis mellitus basada en la producció d'insulina pel múscul esquelètic en un model caní. Els resultats obtinguts en gos es corresponen a les nostres observacions prèvies obtingudes en ratolins tractats amb AAV1-Ins. Per tant, aquest treball indica que l'expressió d'insulina pel múscul esquelètic podria constituir una estratègia de teràpia gènica pel tractament de la diabetis mellitus de tipus 1 en models animals grans.

V. DISCUSSIÓ

El principal objectiu en el tractament de la diabetis mellitus de tipus 1 és la contrarestació de la hiperglucèmia característica de la malaltia, que és el principal factor responsable del desenvolupament de les complicacions secundàries a llarg termini. El tractament habitual per corregir la manca de l'hormona és la teràpia substitutòria amb insulina. Aquest tractament permet la supervivència dels malalts però no és una teràpia perfecte ja que no s'assoleixen els nivells fisiològics d'insulina adequats per mantenir una correcta homeòstasi de la glucosa, donant-se períodes d'hiperglucèmia i d'hipoglucèmia a més de complicacions neurològiques, microvasculars i macrovasculars a llarg termini. Per aquest motiu, es fa necessari l'estudi d'altres possibles tractaments. Una possibilitat que permet ser de gran ajuda és desenvolupar aproximacions de teràpia gènica mitjançant la manipulació genètica del múscul esquelètic amb vectors AAV.

Entre els diferents serotips d'AAV, s'havia demostrat que el vector AAV1 transdueix molt eficientment el múscul esquelètic de ratolí i gos, i a més, es manté l'expressió a molt llarg termini (Riviere et al., 2006; Arruda et al., 2004, Chao et al., 2000; Xiao et al., 1999). Tenint en compte aquests treballs previs, en la primera part d'aquest treball, s'ha estudiat l'habilitat dels vectors AAV1 de transduir el múscul esquelètic de ratolí i obtenir l'expressió a llarg termini de gens d'interès. De manera similar, en aquest estudi, la injecció d'una dosi de 6×10^{10} vg d'AAV1 a múscul esquelètic presenta una eficiència de transducció del voltant del 80%, indicant que aquest vector és un candidat idoni per transduir el múscul esquelètic de ratolí.

En la segona part d'aquest estudi hem demostrat que era possible modificar genèticament el múscul esquelètic mitjançant vectors AAV1 per tal de produir insulina humana, la qual ha estat modificada genèticament per tal de poder ser processada per la endoproteasa furina. Aquests resultats són consistents amb treballs previs on s'expressa la insulina mutada a cèl·lules musculars, a cèl·lules d'hepatoma i a animals transgènics que expressen insulina pel múscul esquelètic (Gros et al., 1997; Gros et al., 1999; Riu et al., 2002).

Al cap de 60 dies després de la inducció de diabetis els animals control diabètics presentaven una marcada hiperglucèmia en alimentació, mentre que l'expressió constitutiva de nivells basals d'insulina en els animals tractats amb AAV1 provocava un increment dels nivells d'insulina circulant, la qual portava a una millora de la hiperglucèmia. L'expressió del gen de la insulina amb les dosis utilitzades, no va produir episodis hipoglucèmics, ja que els animals arribaven a uns nivells de glucosa en sang similars als que presenta un ratolí control sa després d'un dejuni perllongat. Aquest resultat és molt important, ja que s'ha assegurat una dosi constitutiva d'insulina basal suficient per normalitzar la glucèmia i sense assolir hipoglucèmies, ja que un dels problemes més importants de la teràpia substitutòria és la hipoglucèmia deguda a l'excés dels nivells de l'hormona en sang (DCCT, 1993). A més a més, tot i que el múscul esquelètic és un dels teixits perifèrics que expressa un major nombre de receptors d'insulina (Lamothe et al., 1998, White et al., 1994), aquest era capaç de produir suficient quantitat d'hormona perquè pogués ser secretada a circulació i millorar així la disminució d'insulina associada al desenvolupament

de diabetis. D'altres treballs usant ratolins transgènics que expressen insulina a múscul (Riu et al., 2002) han mostrat resultats similars.

La manca d'insulina provoca una disminució en l'expressió de GLUT4 i una disminució del transport dependent d'insulina a múscul esquelètic (Brucelin et al. 1993; Napoli et al. 1995; Kahn et al., 1992). Per contra, el tractament amb insulina exògena normalitzava el metabolisme de la glucosa en aquest teixit. De manera similar, la producció constitutiva a nivells basals d'insulina pel múscul esquelètic era capaç de normalitzar els nivells del transportador en aquest teixit comparat amb el control diabètic. Això indicava que aquests ratolins han recuperat el metabolisme normal del múscul en condicions de diabetis. Aquests resultats van ser consistents amb la funció autocrina/paracrina de la insulina a múscul esquelètic, que portaria a un increment en la captació i utilització de la glucosa, contribuint a la reducció de la hiperglucèmia. Un paper clau en el transport i la fosforilació de la glucosa en la regulació de la captació del sucre ha estat també observat en ratolins transgènics que sobreexpressen GLUT4 (Brucelin et al., 1993; Lombardi et al., 1997) o bé GK (Otaegui et al., 2000) a múscul esquelètic. Per tant, amb aquesta aproximació, hem demostrat que es pot mantenir una dosi basal d'insulina a llarg termini, sense riscos d'episodis hipoglucèmics. Així, es podria mantenir activa la maquinària de captació i utilització de glucosa pel múscul esquelètic i probablement, també per altres teixits, com el fetge.

El desenvolupament d'hiperglucèmia està associada a l'aparició de polidipsia i polifàgia, dos dels principals símptomes clínics de la diabetis (DTCC, 1993). En

aquest treball hem observat que el consum d'aigua i de menjar en els ratolins tractats amb AAV-1 estava millorat respecte al consum observat en un ratolí diabètic. Això estava d'acord amb la observació de l'aspecte general i sobretot del pelatge dels animals tractats amb AAV1-Ins, ja que estava millorat respecte al dels diabètics no tractats i era similar a l'observat en els ratolins control sans. Això concordava amb que la millora de la hiperglucèmia diabètica, atenuava els principals símptomes clínics associats a la malaltia.

Degut a la contrarestació parcial de la hiperglucèmia en condicions d'alimentació, es va estudiar l'efecte que tindria l'administració d'una dosi baixa d'insulina exògena soluble (només un 10% de la insulina que s'hauria d'administrar a un ratolí diabètic per a assolir la normoglucèmia). Aquest treball demostra que els ratolins tractats amb AAV1-Ins a múscul esquelètic tenen una resposta més ràpida i forta en front a una injecció d'insulina exògena soluble a una dosi molt baixa, indicant que els animals són més sensibles al l'acció de l'hormona. En canvi, els ratolins diabètics control es mantenien hiperglucèmics al llarg de tot l'experiment. Els resultats obtinguts suggerien que una combinació basada en l'administració de dosis baixes d'insulina exògena soluble conjuntament amb l'expressió d'insulina a múscul esquelètic era capaç de contrarestar la hiperglucèmia diabètica i mantenir la normoglucèmia en animals diabètics, tant en condicions d'alimentació com en condicions de dejú. Per tant, la modificació genètica del múscul esquelètic per tal de produir nivells basals d'insulina durant la diabetis pot ser un mètode més eficient que l'administració de preparacions d'insulina d'acció lenta en el manteniment de la normoglucèmia entre àpats. Tot i que l'eficaç regulació de la producció i de la

secreció d'insulina és molt difícil reproduir (Riu et al., 2002; Dong et al., 2001; Lee et al., 2000; Thule PM i Liu JM, 2000), una manera de mimetitzar el perfil de secreció de l'hormona seria, per tant, una teràpia combinada basada en l'expressió de nivells basals d'insulina pel múscul esquelètic, conjuntament amb l'administració de baixes dosis d'insulina exògena soluble. Això, mantindria un control més acurat de la glucèmia, així com milloraria l'estat general de l'animal i retrassaria l'aparició de complicacions secundàries.

L'expressió constitutiva d'insulina pel múscul esquelètic havia pogut revertir la hiperglucèmia en dejú però no era capaç de contrarestar els pics de glucèmia postpandrials. Per això, en la tercera part del treball, vam proposar estudiar el possible efecte conjunt de la insulina amb un increment en la fosforilació de la glucosa. Així, per tal d'incrementar la fosforilació de la glucosa a la cèl·lula muscular, vam expressar, conjuntament amb la insulina, la GK,. Aquest enzim té una K_m molt més elevada per a la glucosa (8 mmol/l) i no és inhibida per la glucosa-6-P (Printz et al., 1993), i a més, presenta una cinètica cooperativa amb la glucosa. Aquesta combinació, permetria al múscul esquelètic la generació d'un "sensor de la glucosa", el qual podria captar la glucosa gràcies a l'acció de la insulina i fosforilar-la només quan aquesta és present en elevades concentracions, gràcies a l'acció de la GK (Matschinsky 2004; Matschinsky et al., 2006).

Els animals diabètics tractats amb vectors AAV1-Ins+GK assolien la normoglucèmia tant en condicions d'alimentació com en dejú. La GK, degut a les seves característiques cinètiques, no captava glucosa quan els valors de

glucosa en sang eren reduïts, i augmentava molt la captació de glucosa quan els valors en sang eren elevats. D'aquesta manera contribuïa al manteniment de la normoglicèmia, tant en dejú (evitant la hipoglicèmia) com en alimentació (disminuint la hiperglicèmia). Per contra, la normalització de la hiperglicèmia en alimentació no s'observava en els ratolins transduïts només amb AAV1-Ins i sense GK. Tampoc van assolir normalització de la glucosa en estudis previs d'expressió d'insulina a múscul esquelètic mitjançant teràpia gènica no viral (Martinenghi et al., 2002), ni ratolins diabètics que expressen insulina a pàncrees exocrí (Shifrin et al., 2001), ni amb ratolins transgènics que expressaven insulina (Riu et al., 2002) o GK al múscul esquelètic (Otaegui et al., 2000), suggerint que es requeriria l'acció combinada d'ambdós gens, la insulina i la GK.

La generació del sensor de la glucosa en la teràpia conjunta amb AAV1-Ins+GK representava doncs, una aproximació més efectiva pel tractament de la diabetis. A més, en cap moment durant els 4 mesos de durada de l'experiment, no es varen observar episodis d'hipoglicèmia, probablement degut a que els nivells d'insulina eren basals i a més, que quan els nivells de glucosa en sang eren baixos (com per exemple durant períodes de dejuni) l'activitat de la GK es trobava disminuïda, cosa que evitava l'entrada excessiva de glucosa a la cèl·lula muscular. Això coincideix amb els resultats obtinguts prèviament en ratolins transplantats amb miotubs que expressen l'enzim GK (Otaegui, 2002) o ratolins transgènics que expressen insulina i GK conjuntament (Mas et al., 2006).

En el nostre estudi, la normalització de la glucèmia en ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK depenia de la dosi dels gens administrada. Així, la injecció d'AAV amb la dosi més baixa de 2.4×10^{10} vg contrarestav només parcialment la hiperglucèmia, mentre que la utilització de la dosi més alta de 6×10^{10} vg els portava a valors de glucosa lleugerament hipoglucèmics. No obstant, tots els animals varen sobreviure normalment durant tot l'experiment, sense cap tipus d'episodi hipoglucèmic. Així doncs, tal i com s'havia descrit prèviament, els nivells d'expressió d'un gen produït pel múscul esquelètic després de la injecció d'AAV venen determinats per la dosi de vectors utilitzada (Riviere et al., 2006; Manno et al., 2003, Kay et al, 2000).

En tots els animals tractats amb Stz es va observar una reducció important dels nivells d'insulina murina indicant que les cèl·lules β del pàncrees havien estat destruïdes. En els ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK, els nivells d'insulina total eren similars als nivells observats en el control sa, degut a la insulina humana produïda pel múscul esquelètic. En el grup tractat amb AAV1-Ins+GK es va detectar la presència de peptid C humà circulant, indicant que la insulina humana mutada transferida pel vector AAV1, era correctament processada pel múscul esquelètic. Tot i així, estudis previs, han mostrat que només al voltant del 70% de la insulina produïda pel múscul esquelètic és processada correctament i la resta és secretada en forma de proinsulina (Gros et al., 1998). Per tant, part de l'hormona detectada en sèrum dels ratolins tractats amb AAV1-Ins seria proinsulina la qual és 100 vegades menys activa que la insulina madura. No obstant això, era suficient per normalitzar l'homeòstasi de la glucosa.

L'expressió d'insulina i GK a múscul esquelètic assolia la normalització dels nivells d'expressió de GLUT4 a la membrana, probablement degut a la producció basal d'insulina. Aquest resultat també s'havia observat en ratolins tractats amb AAV1-Ins a múscul esquelètic, així com a ratolins transgènics que expressen insulina o bé insulina+GK específicament a múscul esquelètic (Riu et al., 2002, Mas et al., 2006). No obstant, la normalització en els nivells de GLUT4 representa una condició necessària però no suficient per a la restauració de la normoglicèmia en animals diabètics. En aquest sentit, la sobreexpressió de GLUT4 i HKII a múscul esquelètic d'animals tractats amb STZ no fou capaç de normalitzar la hiperglicèmia en un model transgènic, degut al fet que GLUT4 necessita l'acció de la insulina per ser translocat a la membrana plasmàtica (Lombardi et al., 1997).

Durant el procés diabètic, a causa de la manca d'insulina, l'increment de la relació entre el glucagó i la insulina dona lloc a un augment de l'activitat de PEPCK a fetge (Pilkis et al., 1992). En ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK, l'augment dels nivells d'insulina circulant, així com la disminució dels nivells de glucosa portava a una disminució dels nivells d'expressió de PEPCK a fetge. Aquest fet provocava molt probablement una disminució en l'alliberació de glucosa per part del fetge, que conjuntament amb l'increment de la captació de glucosa pel múscul, contribuiria al manteniment de la normoglicèmia (Furtado et al, 2002). S'han descrit aproximacions de teràpia gènica per a la diabetis basades en la modificació genètica del fetge que utilitzen sistemes de regulació transcripcional per a la producció d'insulina, com per exemple l'ús de

promotors específics de fetge que expressen insulina responenent a la interacció entre els nivells de glucosa, d'insulina i d'altres hormones (Lee et al., 2000). No obstant, cap d'aquestes aproximacions ha assolit la normoglicèmia, ni en estat d'alimentació ni en dejuni, com tampoc la resposta normal al test de tolerància a la glucosa. (Meyer et al., 1991; Doiron et al., 1994; Streeper et al., 1997; Robertson et al., 1994).

En determinar la resposta dels animals a una sobrecàrrega a la glucosa en els ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK es va observar que eren capaços de contrarestar l'augment de la glucèmia i d'assolir altra vegada els seus nivells basals al final del test. En la nostra aproximació, la normalització a la sobrecàrrega de glucosa seria deguda a l'acció del sensor de la glucosa generat al múscul esquelètic: per una banda, a la recuperació dels nivells de GLUT4 a membrana, degut a la producció d'insulina, conjuntament amb l'increment de fosforilació de glucosa provocada per la GK, la qual incrementaria la utilització de glucosa al múscul esquelètic depenent de la concentració de sucre circulant. A més a més, també contribuiria a la normalitat de la sobrecàrrega del sucre la disminució de producció de glucosa pel fetge. Així doncs, la coexpressió d'insulina i de GK al múscul compensava les limitacions observades en els transgènics que expressen insulina (Riu et al. 2002) i en els transgènics de GK (Otaegui et al., 2000) a múscul esquelètic.

L'increment de la captació i la utilització de glucosa per part del múscul, així com la producció d'insulina en els ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK, permetia millorar completament l'estat general dels ratolins diabètics. En aquest treball

hem estudiat si la normalització en els animals tractats amb AAV1-Ins també prevé l'aparició de polidípsia, polifàgia i poliúria. En aquest sentit, el consum d'aigua i de menjar en els ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK estava normalitzada, mentre que els ratolins diabètic presentaven una marcada polidípsia i polifàgia. Per altra banda, s'ha observat que l'aspecte extern dels animals tractats amb AAV1-Ins+GK estava millorat respecte l'aspecte malaltís dels animals diabètics no tractats i era similar a l'observat en els ratolins control sans. Així doncs, aquests resultats ens indicaven que l'expressió d'insulina i de GK per part del múscul esquelètic, a més a més de contrarestar el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica en alimentació, atenuava els principals símptomes clínics associats a la malaltia.

Degut a la manca d'insulina, en la diabetis s'incrementa la proteòlisi muscular ja que les cèl·lules han de subministrar aminoàcids precursors gluconeogènics per al fetge. Aquest fet, porta a una reducció gradual de la massa muscular. A més, també s'observa pèrdua de teixit adipós ja que sense insulina hi ha un increment en la lipòlisi, degradant àcids grassos per mantenir el múscul esquelètic. Per contra, els animals tractats amb AAV1-Ins+GK no presentaven pèrdua de teixit muscular ni de teixit adipós, suggerint que la insulina produïda era biològicament activa i que tenia efectes sobre d'altres teixits. Per altra banda, l'analitzar talls histològics de múscul transduït amb AAV no es va observar cap tipus de dany histològic degut a l'administració de vectors virals. A més, la dosi de AAV per quilogram de pes utilitzada en aquest experiment era una dosi 18 cops més baixa a l'utilitzada en experiments amb humans, en els

quals tampoc s'observava cap tipus de reacció adversa (Manno et al., 2003; Flotte et al., 2004).

La hiperglucèmia diabètica es la responsable del desenvolupament de les complicacions secundàries a llarg termini, entre altres, del sistema nerviós (neuropatia diabètica) (Brownlee, 2001). També s'han descrit problemes gastrointestinals deguts a alteracions del sistema nerviós que provoquen alteracions en el funcionament del sistema nerviós entèric, que es tradueixen en maldigestió, diarrea i dilatació gastrointestinal (Brownlee, 2001). Això concordava amb l'observació dels ratolins diabètics, els quals presentaven una marcada distensió gàstrica, de l'intestí prim i gruixut i del cec. A més, presentaven una absència de teixit adipós a la cavitat abdominal. Per contra, els ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK presentaven un aspecte similar als controls sans i no s'observaven distensions intestinals del sistema nerviós entèric. Tampoc es va observar pèrdua de terminacions nervioses ni pèrdua de fibres en el plexe subepidèrmic de les glàndules sudorípares en animals després de 4 mesos de la inducció de diabetis. Per tant, un punt clau d'aquesta aproximació era que un cop la glucèmia ha estat normalitzada, les complicacions secundàries associades a la diabetis no es desenvoluparien, cosa que milloraria moltíssim la qualitat de vida dels pacients diabètics.

Així doncs, en resum, l'aproximació de teràpia gènica descrita en aquest treball consisteix en la manipulació del múscul esquelètic per tal de generar un sensor de la glucosa capaç de regular l'homeòstasi general del sucre en animals diabètics. Aquesta regulació s'ha aconseguit mitjançant l'acció sinèrgica de 2

gens: la insulina i la GK. L'expressió d'insulina i de GK amb una sola injecció de vectors AAV1 normalitzava la glucèmia durant els quatre mesos de durada de l'estudi. A més a més, a diferència d'altres tècniques de teràpia gènica per expressar insulina al múscul esquelètic com l'electrotransferència de DNA, aquesta ens permetia evitar contínues readministracions per mantenir l'expressió a llarg termini (Martinenghi et al., 2002). Per altra banda, a diferència dels ratolins transgènics, en els quals totes les fibres musculars expressaven els gens de la insulina i la GK (Mas, 2004), en els ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK només s'expressen els gens als músculs *tibialis cranealis*, *quàdriceps* i *gastrognemius*. Així doncs, en aquest estudi mostràvem que la transducció dels gens de la insulina i la GK a, aproximadament, un 8% de la massa muscular, és suficient per a contrarestar el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica tant en alimentació com en dejuni.

Resultats actuals han descrit que la injecció intramuscular d'AAV provoca una resposta immunitària molt disminuïda, a diferència d'altres vectors virals o no virals que són molt immunogènics (Riviere et al., 2006; Flotte et al., 2004) i no requereix de protocols d'immunosupressió, com succeeix en els casos de modificació de cèl·lules hepàtiques o el transplantament d'illots (Bottino et al., 2003; Trucco et al., 2005). Addicionalment, la nostra estratègia pot presentar millores notables comparant amb d'altres estratègies actualment en estudi, com la inhalació d'insulina, que provoquen el risc d'aparició d'anticossos contra insulina i possibles alteracions de paràmetres pulmonars (Heise et al., 2005). A més a més, comparant amb d'altres treballs de prevenció de la diabetis mitjançant la producció de citoquines immunomoduladores a múscul, (Goudy

et al., 2001; Song et al., 2004), la nostra estratègia permet tractar l'animal en qualsevol moment, un cop s'ha desenvolupat obertament la diabetis.

La importància d'aquests resultats obtinguts en ratolí ens van portar a estudiar si els vectors AAV1 eren capaç de transduir eficientment el múscul esquelètic d'un gos diabètic com a fase preclínica, abans de poder desenvolupar aproximacions terapèutiques en pacients humans. Estudis previs havien demostrat que el vector AAV1 pot transduir eficientment el múscul esquelètic de gos (Arruda et al., 2004; Liu et al., 2004). De manera similar en el múscul esquelètic de ratolí, es va observar que 7 dies després de realitzar una injecció intramuscular d'AAV1-GFP es produïa una elevada eficiència de transducció, arribant a assolir nivells del 80% de cèl·lules que expressaven el gen marcador.

El gos beagle representa un model excel·lent per usar en el camp de la diabetis. En la majoria d'estudis previs s'han emprat diferents tècniques d'inducció de diabetis experimental, com la pancreatectomia (Ohashi et al., 1991) o l'administració d'una dosi d'Stz o d'una dosi d'Alloxan (Rerup et al., 1970). Tot i així, s'han observat efectes tòxics de les drogues a d'altres teixits i molta mortalitat (Black et al., 1980). Tal i com s'ha descrit anteriorment, la combinació d'Alloxan i Stz té l'avantatge d'usar dues dosis més baixes de les drogues sense mostra de toxicitat a d'altres òrgans a part del pàncrees (Anderson et al., 1993). Aquesta combinació representa un bon model d'inducció de diabetis en gos que evita la mortalitat i la toxicitat de la droga. Per tant, es va utilitzar aquest mètode per induir la diabetis experimental a un gos.

Al cap de 3 dies de la inducció de la diabetis, els nivells d'insulina circulants van disminuir dràsticament, indicant una destrucció efectiva de les cèl·lules β del pàncrees. Després del tractament amb AAV1-Ins, la insulinèmia va incrementar fins a arribar a valors similars als observats prèviament a la injecció d'Stz-Alloxan, quan l'animal era completament sa. Paral·lelament, s'observava presència de peptid C humà en sèrum a partir del dia de la injecció amb AAV1-Ins, indicant que probablement, l'increment dels nivells total d'insulina eren deguts al processament de la insulina humana produïda pel múscul esquelètic. Aquests resultats concordaven amb el que havíem observat prèviament en els experiments amb AAV1-Ins en ratolins diabètics. Això també coincidia amb estudis previs que havien demostrat que el vector AAV1 pot transduir eficientment el múscul esquelètic de gos amb la finalitat de secretar proteïnes a la circulació (Arruda et al., 2004).

Després del tractament amb AAV1-Ins, el gos assolí la normogluccèmia en dejú. Per tant, aquests resultats ens indicaven que el múscul esquelètic era capaç de produir constitutivament una quantitat d'insulina basal perquè pogués ser secretada a circulació i compensar així la disminució associada al desenvolupament de diabetis. Tampoc es va observar una disminució de la quantitat d'insulina total al llarg del temps que va durar l'experiment, tal i com era d'esperar ja que estudis previs han demostrat que l'expressió derivada d'AAV a múscul esquelètic en gossos pot durar fins a més de 3 anys (Arruda et al, 2004; Herzog et al., 1999).

El test de tolerància a la glucosa per via oral ha demostrat ser una tècnica eficient per detectar la intolerància a la glucosa en animals diabètics (Watanabe et al., 2004). Després de la injecció d'Stz-Alloxan, la sobrecàrrega de glucosa provocava un elevat increment de glucèmia que es mantenia al llarg del test, fet que indicava una destrucció de les cèl·lules β i una falta de producció d'insulina, com era d'esperar. En canvi, després de la sobrecàrrega oral de glucosa, la corba del gos tractat amb AAV1-Ins tan sols diferia lleugerament a la corba de glucosa que mostrava aquest gos quan era sa. No obstant, la producció constitutiva d'insulina per part del múscul esquelètic era a nivells basals i per tant no podia contrarestar totalment la sobrecàrrega de glucosa. Aquest resultat era molt similar al observat en la primera part d'aquest estudi en ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins i també a altres models de ratolins transgènics que expressen insulina pel múscul esquelètic (Mas, 2004; Riu et al., 2002) o bé, ratolins que expressen insulina al múscul esquelètic mitjançant teràpia gènica no viral (Martinenghi et al., 2002).

Aquesta possible teràpia també seria d'interès en medicina veterinària, ja que el tractament de la diabetis mellitus de tipus 1 en gossos representa una càrrega, tant pels propietaris com pel mateix animal. El gos s'ha d'ingressar una setmana, a l'hospital, temps en el qual i se li ha d'ajustar la dosi d'insulina idònia (Nelson et al., 2003). A més, s'ha de punxar amb insulina exògena dos cops al dia, assegurant-se que l'animal menja després de cada injecció per evitar el possible risc d'episodis hipoglucèmics associat a la insulina (Nelson et al., 2003). Així doncs, els nostres resultats tenen una gran importància en medicina veterinària ja que suggereixen una millora notable de la teràpia actual,

ja que amb una sola injecció de vectors AAV1-Ins n'hi hauria prou per millorar les condicions fisiològiques de l'animal. A més, no hi hauria episodis hipoglucèmics i tampoc seria necessària la manipulació del gos amb dues injeccions diàries, representant una millora notable pel benestar de l'animal i pels propietaris. Aquesta millora general de l'animal també disminuiria, probablement, un dels símptomes característic de la diabetis: la poliúria.

En resum, aquest estudi demostra que la manipulació del múscul esquelètic per tal que expressi insulina pot esdevenir un tractament alternatiu a les teràpies actuals per al tractament de la diabetis tipus 1. Tot i així, per tal d'assolir un perfil igual al control sa, els resultats evidencien la necessitat d'incrementar la captació de glucosa mitjançant l'activitat de la GK per tal de normalitzar la hiperglucèmia diabètica en gossos, tal i com hem observat en ratolins tractats amb AAV1-Ins+GK. No obstant, aquest treball posa en evidència l'efectivitat preclínica del procediment i per tant, aquest estudi pot servir com a un primer pas pel desenvolupament de futurs assajos clínics en medicina veterinària i en humans.

VI. CONCLUSIONS

1. S'ha posat a punt la transducció del múscul esquelètic de ratolí mitjançant la utilització de vectors AAV1 que transportaven un gen marcador (AAV1-GFP).
2. L'expressió constitutiva d'insulina pel múscul esquelètic de ratolins diabètics mitjançant vectors AAV1 normalitzava completament la hiperglucèmia en dejú sense presència d'episodis hipoglucèmics. Tot i així, no s'aconseguia revertir completament la hiperglucèmia en condicions d'alimentació.
3. Una teràpia combinada usant una dosi baixa d'insulina exògena soluble conjuntament amb l'expressió basal d'insulina a múscul esquelètic contrarestavava la hiperglucèmia diabètica en condicions d'alimentació.
4. L'expressió conjunta d'insulina i de GK a múscul esquelètic de ratolins diabètics mitjançant vectors AAV1 actuava com a un "sensor" de la glucosa que permetia revertir completament el desenvolupament de la hiperglucèmia, tant en condicions d'alimentació com de dejú, sense aparició de períodes hipoglucèmics.
5. Els ratolins diabètics tractats amb AAV1-Ins+GK responien correctament enfront d'una sobrecàrrega de glucosa i presentaven una normalització en el consum d'aigua i de menjar.
6. La insulina produïda pel múscul tenia un efecte autocrí/paracrí sobre la pròpia cèl·lula muscular, i també endocrí sobre la resta de teixits perifèrics com el fetge.

7. El manteniment de la normoglucèmia mitjançant l'expressió d'insulina i de GK al múscul prevenia el desenvolupament de les complicacions secundàries associades a la diabetis.
8. Per tant, la manipulació del múscul esquelètic en ratolins diabètics per tal que expressi insulina i GK pot esdevenir, un tractament alternatiu a les teràpies actuals per al tractament de la diabetis de tipus 1.
9. S'ha posat a punt la transferència de gens a múscul esquelètic de gos mitjançant la injecció intramuscular de vectors AAV1 amb gen marcadors. L'eficiència de transducció ha estat similar a la observada en ratolins.
10. La producció d'insulina per part del múscul esquelètic normalitzava la glucèmia en situació de dejuni en un gos diabètic després del tractament amb AAV1-Ins.
11. Es va detectar pèptid C humà circulant indicant que la insulina humana mutada era correctament processada en el múscul esquelètic de gos diabètic i secretada a la circulació.
12. Els resultats obtinguts posen en evidència l'efectivitat preclínica de la manipulació genètica del múscul esquelètic d'un gos diabètic per produir insulina mitjançant vectors AAV1.

VII. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS.

1.1. Soques bacterianes i vectors plasmídics.

La soca bacteriana utilitzada com a portadora de les diferents construccions plasmídiques va ser la DH5 α d'*E.coli*. El creixement d'aquestes cèl·lules es va realitzar a 37°C en el medi LB (Luria Broth), contenint 50 mg/ml de l'antibiòtic Ampicil·lina o 50 mg/ml de l'antibiòtic Kanamicina segons la resistència del plasmidi en concret per a la seva selecció. Les cèl·lules es van conservar a -80°C en medi LB contenint un 20% (vol/vol) de glicerol.

Els vectors plasmídics emprats en aquest treball han estat els següents: pCMV/Ins, pCMV/GK, pGFP-C1, pBS-18ScDNA, pCMV-GLUT4.

1.2. Animals.

En aquests experiment, es van utilitzar gossos beagle i ratolins CD1. Els ratolins utilitzats tenien entre 8 i 9 setmanes d'edat i procedien de CRIFFA (França) i del servei d'Establació del Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica (UAB). Els ratolins van ser alimentats *ad libitum* amb dieta estàndard (Panlab, Espanya) i mantinguts amb cicles de llum de 12 hores de durada i temperatura constant. Al final de l'experiment els ratolins eren eutanasiats mitjançant una sobredosi d'Halotane inhalat en una càmara gasosa.

Els gossos Beagle eren alimentats un cop al dia amb 300g de pinso i aigua *ad libitum*. Els animals van ser allotjats en les gosses de l'Hospital Clínic Veterinari de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. Els estudis amb gossos van ser realitzats amb col·laboració del Dr. Fèlix García i la Dra. Anna Andaluz del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de l'Hospital Clínic Veterinari. Tots els animals es van utilitzar d'acord amb la legislació vigent i amb l'aprovació del Comitè d'Ètica i d'Experimentació Animal i Humana de la UAB. Tots els gossos utilitzats eren considerats animals sans en base a un examen clínic, una anàlisi hematològica i una anàlisi bioquímica. Al final de l'experiment, tots els animals eren eutanasiats utilitzant una solució intravenosa de pentobarbital sòdic.

1.3. Reactius de treball.

Els reactius emprats en aquest treball es van adquirir de les cases comercials Roche (Diagnostics GmbH, Germany), Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St.Louis, MO, EEUU), Pharmacia-LKB (Uppsala, Suècia), Qiagen GmbH (Hilden, Alemanya), Bio 101 Inc (La Jolla, CA, EEUU), Schleicher & Schuell (Keene, New Hampshire), (CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvette, França), Crystal chem Inc. (Chicago, EEUU) i Wako Chemicals (Neus, Alemanya). Els productes marcats radioactivament [α - ^{32}P] dCTP s'adquiriren a Amersham Biosciences. L'estreptozotocina utilitzada per induir diabetis experimental es va adquirir a Sigma. Els medis de cultiu de

les línies cel·lulars, el sèrum fetal boví, el sèrum de cavall, la tripsina i la barreja de penicil·lina/estreptomicina eren de GIBCO-BRL.

1.4. Sondes.

La sonda d'insulina corresponia al fragment de 0,4kb del fragment EcoRI-EcoRI del cDNA de la insulina humana (cedit per el Dr. W.Rutter). La sonda GK corresponia al fragment EcoRI-EcoRI de 2.3Kb del cDNA de la GK de rata (cedit pel Dr.P.lynedjian, Universitat de Ginebra, Ginebra, Suïssa). La sonda PEPCK utilitzada pel Northern Blot corresponia al fragment de 1.7 Kb SphI-SphI del cDNA de la PEPCK (cedit per el Dr R.W.Hanson, Case Western Reserve University, Cleveland). La sonda GLUT4 corresponia al fragment de 2.4Kb EcoRI-EcoRI del cDNA. La sonda 18S corresponia al fragment de 5.7 Kb EcoRI-EcoRI del cDNA del rRNA humà (cedit pel Dr. Gamboa).

1.5. Oligonucleòtids.

Els oligonucleòtids utilitzats per a la realització de la RT-PCR de GFP varen ser sintetitzats per Proligo Biochemie GmbH. Les seqüències dels encebadors utilitzats són les següents:

GFP (Green Fluorescent Protein). Directe: GCAGCCTTTGTGAACCAACAC

GFP (Green Fluorescent Protein). Revers: CCCC GCACACTAGGTAGAGA

CMV (Citomegalovirus). Directe: GTTCCTAACGGTCAGTTCACAG

CMV (Citomegalovirus). Revers: CGGGTTATTGCCATGACTGCC

2. MÈTODES.

2.1. Obtenció de DNA.

2.1.1. Transformació de cèl·lules d' *E. Coli*.

Les cèl·lules DH5 α d' *E. coli* utilitzades (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EEUU), són transformades mitjançant el mètode anomenat *Heat Shock* o Xoc Tèrmic, segons el qual s'incuben les cèl·lules competents amb el DNA plasmídic en qüestió 30 minuts en gel; posteriorment s'incuben 20 segons a 37 °C i es deixen 5 minuts en gel. S'afegeixen 200 μ l de LB (Triptona 10g/l, extracte de llevat 5g/l i NaCl 5g/l) i s'incuben 40 minuts a 37 °C en agitació. Finalment es plaquegen amb el medi selectiu adequat, en el nostre cas LB + 50 μ g/ml d'ampicil·lina o bé LB + 50 μ g/ml de kanamicina.

2.1.2. Obtenció de plasmidi a baixes concentracions.

Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic es van realitzar minipreparacions de DNA seguint el protocol de llisi alcalina descrit originalment per Birnboim i Doli (1979) a partir de volums petits de cultiu (2-3 ml). El plasmidi obtingut d'aquesta manera (uns 3-4 μ grs/ml de medi de cultiu) es troba majoritàriament en forma circular tancada covalentment (supercoiled) i, en general, és susceptible de ser sotmès a manipulacions enzimàtiques sense necessitat de purificacions posteriors.

El mètode consisteix primer de tot en una resuspensió del sediment bacterià amb 200µl de la solució de liozima (Tris-HCl pH 8.0 25mM, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM, Liozima 5 mg/ml i RNasa 100 mg/l) seguida per una llisi alcalina amb 400µl de solució de llisi (NaOH 0.2 M i SDS 1%). Segueix una precipitació selectiva del DNA genòmic bacterià i proteïnes desnaturalitzades per acció de 400µl d'una solució concentrada d'acetat potàssic 3M a pH 4,8 amb àcid acètic glacial 2M. El DNA plasmídic és purificat després mitjançant precipitació amb isopropanol i rentats amb etanol al 70%. L'RNA bacterià era degradat mitjançant RNasa A, que és afegida en la primera dissolució .

2.1.3. Obtenció de plasmidi lliure d'endotoxines a altes concentracions.

Per a la injecció intramuscular d'una solució de DNA en ratolins, es va utilitzar DNA lliure d'endotoxines. Les endotoxines (lipopolisacàrids o LPS), són components de la membrana dels bacteris Gram negatius; influencien fortament la transfecció de DNA en les cèl·lules en cultiu, de manera que nivells creixents d'endotoxines comporten eficàcies agudament reduïdes de transfecció. A més, és extremadament important utilitzar DNA plasmídic lliure d'endotoxines en qualsevol protocol de teràpia gènica ja que poden causar febre, síndrome endotòxica de xoc, i l'activació de la cascada del complement tant en animals com en humans. Així doncs, s'utilitzaren els kits comercials Qiagen Endofree Plasmid Mega Kit, a partir d'1-1`5 litres de medi de cultiu. El mètode es basa igualment en una lisi alcalina, però la purificació del DNA es va realitzar pel mètode de lisi alcalina amb posterior purificació del DNA plasmídic amb columnes de Qiagen^{MR} (QIAGEN, Crawley, UK). Aquest protocol està dissenyat per a l'obtenció de fins a 2.5 mg per megapreparació.

2.2. Anàlisi del DNA.

2.2.1. Manipulació enzimàtica del DNA.

Els enzims de restricció són enzims que tallen dsDNA específicament per una seqüència concreta. Són presents en procariotes els quals els utilitzen com a sistema de defensa contra l'entrada de DNA estrany. Aquests enzims són purificats a partir de bacteries o fongs, presenten una elevada especificitat respecte a seqüències curtes de DNA.

Cada enzim de restricció presenta requeriments de força iònica i condicions de reacció específiques, pel que, en cada cas, se segueix el protocol recomanat per la casa subministradora d'enzims. En general, es digereix el DNA amb una relació de 5 Unitats d'enzim per μg de DNA, sense excedir el 5% de glicerol en el tampó de restricció. Les digestions de DNA plasmídic es realitzen durant 1-2 hores, mentre que les de DNA genòmic es deixen digerint durant tota la nit. Els productes de restricció s'analitzen en gels d'agarosa/TAE.

2.2.2. Gels d'agarosa.

L'electroforesi en gels d'agarosa és una tècnica que s'utilitza per la separació analítica de fragments de DNA. La visualització dels fragments de DNA s'aconsegueix mitjançant la incorporació al gel del colorant fluorescent Bromur d'Etidi ($0.5\mu\text{g/ml}$), que s'intercala entre les dues cadenes de DNA i que provoca una banda ataronjada quan aquestes són il·luminades amb llum ultraviolada

d'ona curta (300 nm). Aquesta tècnica permet detectar fragments d'un mínim de 5 ng de DNA.

La resolució dels gels d'agarosa ve determinada per la concentració d'agarosa i permet discriminar entre bandes de mida molecular pròxima mitjançant variacions en la seva concentració. En aquest treball s'utilitzen, rutinàriament, gels amb tampó TAE (Tris-acetat pH=8,3, EDTA 1mM) d'una concentració d'agarosa de l'1%. Per a determinar la mida de pes molecular de les diferents bandes de DNA s'usen els marcadors de pes molecular d'1 Kb ladder de Invitrogen i el Marker X de Roche.

La mostra es barreja amb tampó de càrrega 10X (Glicerol 50%, EDTA 100 mM, SDS 1% i blau de Bromofenol 0.1 %) i es deixa córrer a 60V durant dues hores.

2.2.3. Purificació dels fragments de DNA.

Un cop corregudes les digestions enzimàtiques desitjades en un gel electroforètic es tallen les bandes desitjades per a la seva purificació del gel. El mètode GeneClean® és un mètode ràpid per a la purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa basat en la dissolució del fragment del gel que conté la banda desitjada en una solució saturada de NaI. Aquestes condicions permeten una absorció selectiva del DNA en una matriu de sílice. Posteriorment es renta el DNA i s'elueix en condicions de baixa força iònica. En aquest treball es va usar el kit comercial GENE CLEAN II ® Kit (QBiogene Inc, CA, USA) seguint les instruccions del subministrador.

2.3. Construcció de molècules híbrides de DNA.

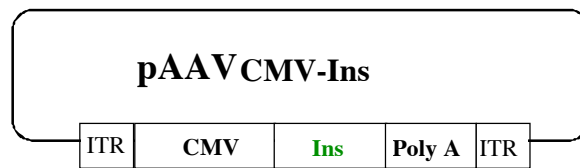
2.3.1. Lligació de fragments de DNA.

Per construir molècules híbrides de DNA, els fragments de DNA inicials són purificats, combinats i tractats amb la DNA lligasa del bacteriòfag T4. Els productes de la mescla de la lligació són introduïts en cèl·lules competents DH5 α d'*E. coli*. Les cèl·lules que han adquirit el DNA plasmídic es seleccionen mitjançant l'addició de l'antibiòtic adequat, confirmant posteriorment l'obtenció de la molècula híbrida mitjançant l'anàlisi de DNA. En aquest treball s'utilitzen per a la construcció dels gens quimèrics dels diferents plasmidis.

2.3.2. Clontage dels plasmidis.

Es va clonar el gen de la insulina humana i de la glucoquinasa de rata sota el control del promotor constitutiu del citomegalovirus (CMV). El vector utilitzat en ambdós casos consistia en el plasmidi productori de vectors adenoassociats pGG2 (Généthon, Évry, França). Els inserts de la insulina i de la glucoquinasa provenien de la digestió amb *EcoRI* dels plasmidis pTG-6600-Ins i pTG-6600-GK, respectivament. Es van purificar les bandes de 0,4 i 2,3 Kb i es van lligar els fragments d'insert i vector amb lligasa Roche (F.Hoffmann – La Roche Ltd., Basel, Suïssa) (Figura 1).

A



B

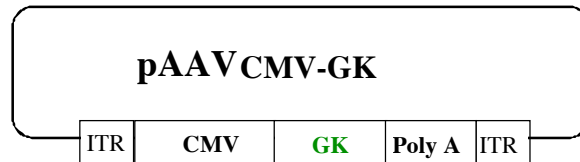


Figura 1. A pCMV-Ins, B pCMV-GK.

2.4. Preparació i anàlisi de l'RNA.

2.4.1. Extracció d'RNA.

L'obtenció de l'RNA total es va realitzar a partir de teixits congelats amb nitrogen líquid mitjançant l'ús de la solució TripureTM Isolation Reagent (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Alemanya) seguint el protocol comercial. És un mètode basat en la separació d'àcids nucleics mitjançant fenol-cloroform i la protecció de l'RNA gràcies a la solució de guanidina tiocianat (inhibidor de ribonucleases), descrit per Chomczynski i Sacchi (1987). L'RNA va ser precipitat amb isopropanol i resuspès en aigua amb DEPC (Dietilpirocarbonat, un altre inhibidor de ribonucleases).

2.4.2. Electroforesis del RNA en gels desnaturalitzants d'agarosa/formaldèhid.

Aquest tipus de gels són utilitzats pel fraccionament del RNA en experiments de "Northern blot", ja que el formaldèhid a concentració 2,2 M actua desnaturalitzant les estructures secundàries del RNA. Aquest fet permet que la migració del RNA sigui proporcional al logaritme del seu pes molecular i possibilita el càlcul de la mida molecular dels diferents missatgers específics. Així doncs, es va realitzar una electroforesi de 4-5h a 30-40V amb un gel d'agarosa al 1% amb 2,2M de formaldehid. Els tampons d'electroforesi i càrrega, que es descriuen a continuació, havien de ser preparats en condicions lliures de contaminació amb ribonucleases per evitar la seva degradació enzimàtica.

<u>Tampó electroforesi.</u>	<u>Gel Agarosa.</u>	<u>Tampó de càrrega.</u>
MOPS 0.2M	Agarosa 1%	Formamida desionitzada
Acetat Na 50mM	MOPS 10X	MOPS/EDTA 10X
EDTA 10 mM	H ₂ O Estèril	Formaldehid 37%
<i>Ajustat a pH 7 amb NaOH 10N.</i>	Formaldehid 37%	H ₂ O Estèril
<i>Filtrat amb un filtre de 0.2µm</i>		Glicerol
		Blau de Bromofenol.
		<i>Homogenitzat i filtrat amb un filtre de 0.2µm</i>

2.4.3. Anàlisi de RNA per "Northern blot" (hibridació DNA-RNA).

La transferència es realitza a membranes de nylon carregades positivament (Roche Diagnostigs Corp., Indianapolis, IN – ref.1 417 240) mitjançant capilaritat per pressió negativa en tampó d'alta força iònica (10xSSC), mitjançant papers (GB002 i GB004 – Schleicher & Schuell, keene, New hampshire). La transferència es realitza en un mínim de 2 hores, però es pot deixar també durant la nit. Un cop finalitzada el filtre és irradiat amb llum ultravioleta d'ona curta per crear unions covalents del DNA amb el nylon mitjançant l'ús d'un UV- Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA).

Les membranes es prehibridaven durant dues hores amb una solució de prehibridació (Formamida desionitzada 50% (vol/vol), NaHPO₄ pH=7 250 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, llet amb pols desnatada 0.1% (p/vol), SDS 1%(p/vol) i DNA desnaturalitzat de salmó 0.5 mg/mL) i s'hibridaven amb els diferents fragments (Ins, GK, GLUT 4 o 18S) que contenen part de la seqüència dels gens.

Per a marcar el cDNA de la sonda radioactivament utilitzàvem el kit comercial Ready to Go[®] (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU) seguint el protocol del fabricant. Primer de tot es bullien 25 ng de sonda en un volum de 45 µl durant 10 minuts. Es posava 2 minuts en gel i es dissolia la nostra sonda amb un complex liofilitzat de la casa comercial que contenia una barreja d'oligonucleòtids, dATP, dGTP, dTTP i el fragment klenow de la DNA polimerasa de *E.coli*. Un cop dissolt s'afegia 5 µl d'una solució rica en [³²P]dCTP i s'incubava a 37°C durant 30 minuts. Aquesta tècnica permet la

síntesi de sondes de DNA uniformement marcades amb una elevada radioactivitat específica ($1,8 \times 10^9$ dpm/mg). La separació dels nucleòtids no incorporats es va realitzar mitjançant columnes de gel filtració de Sephadex G-50 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suècia). Finalment, afegíem la sonda radioactiva al nostre tub d'hibridació i deixàvem hibridar a 65°C durant tota la nit. L'endemà es realitzaven els rentats: el primer de 15 minuts amb una solució de baixa astringència (300mM NaCl, 30mM citrat sòdic i 0,1% SDS) i un altre rentat de 15 minuts d'alta astringència (15mM NaCl, 1,5mM citrat sòdic i 0,1% SDS). Finalment, les membranes van ser exposades a una pel·lícula radiogràfica (Eastman KODAK Company, New York).

2.5. Anàlisi del nivell d'expressió dels gens mitjançant real time PCR quantitativa.

Es van disseccionar els tibialis cranialis, i immediatament es van congelar en nitrogen líquid pel seu emmagatzematge a -80°C . Posteriorment es va extreure el RNA total seguint el protocol de Tripure (Roche). La RT-PCR-Quantitativa va ser realitzada en dos passos, en el primer del quals, 1 μg de RNA va ser retrotranscrit a cDNA en un volum de 20 μl mitjançant el kit Omniscript (Qiagen), utilitzant oligo-dT com a encebador de la reacció i Protector RNase inhibitor (Roche) com a inhibidor de RNases. Al segon, es va realitzar una Real-Time-PCR utilitzant el kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen). Cada reacció de 25 μl contenia 2 μl d'una dilució 1/10 del cDNA aconseguit al primer pas i 10 pmols de cada oligo. Les condicions de temperatures de la PCR eren 15 minuts a 95°C seguit de 45 cicles d'amplificació, que constaven de:

desnaturalització a 95°C durant 15 segons, aparellament 15 segons a 60°C, i extensió durant 30 segons a 72°C. Aquesta es va monitoritzar mitjançant un SmartCycler II (Cepheid).

L'anàlisi d'aquestes dades va ser realitzat segons el descrit a la bibliografia (Pfaffl, 2001).

2.6. Producció de vectors adenoassociats.

2.6.1. Transfecció de cèl·lules.

El mètode utilitzat en aquest treball per a la producció d'AAV consisteix en la triple transfecció de cèl·lules HEK293 amb plasmidis que codifiquen per a: a) les proteïnes de la càpside viral i les necessàries per la replicació; b) les proteïnes adenovirals necessàries per a l'encapsidació; i c) el gen d'interès que serà encapsidat (e.g. Ins o GK). Aquest mètode ofereix un avantatge de seguretat significatiu respecte previs mètodes de producció que utilitzen virus *helper*.

Les cèl·lules productores de vectors adenoassociats (HEK293) són esteses en 10 ampolles giratòries o *roller bottles* amb DMEM al 10% en FBS, amb penicil·lina i glutamina a 37°C al 5% de CO₂ fins a assolir una confluència del 80-90%, moment en el qual es comença la transfecció d'AAV. En primer lloc, s'aliquoten 125 ml d'HEBS (2xHEPES+70 mM de Na₂HPO₄) en 5 tubs cònics de 250 ml (25 ml per tub). A continuació es barregen els volums següents en un altre tub cònic de 250 ml:

- 31,25 ml de CaCl 1M
- 1250 µg pAAV (càpside)
- 1250µg pAAV (plasmidi)
- 2500 µg pWEAD (helper)
- aigua estèril fins a 125ml

Per a la formació dels complexos de clorur càlcic i DNA es barregen, gota a gota, 25ml de la solució de DNAs amb els 25ml de la solució d'HEBS fent servir el vòrtex per agitar aquesta última. La barreja es deixava incubar a temperatura ambient durant 25-30 minuts. Durant aquest període de temps, es canviava el medi de les ampolles a medi de transfecció IDDM al 2% en FBS (uns 200ml de medi per ampolla) i un cop passat el temps s'afegia 25 ml del DNA complexat a cada ampolla. Passats 4 dies es recullen totes les cèl·lules de les ampolles i es centrifuguen en tubs d'1 litre mitjançant a 1000 g durant 20-30 minuts a 4°C. A continuació es ressuspenen les cèl·lules en una solució estèril de TRIS 10 mM, pH 8. El volum final de cèl·lules ha de ser al voltant de 30 ml. En aquest punt es pot congelar la suspensió a -80°C fins a un mes.

2.6.2. Purificació del vector AAV.

La suspensió d'AAV es congela amb nitrogen líquid i es descongela a 37°C tres vegades per llisar les cèl·lules i alliberar els vectors AAV produïts. A continuació s'afegeixen 10 mg de RNasa i 10 ml de DNasa i s'incuba la solució a 37°C durant 30 minuts. S'afegeix deoxicolat sòdic (Roche) a la suspensió final a una concentració de 0,5% i es continua la incubació a 37°C durant 10 minuts. Es

deixa en gel durant 10 minuts més i afegim 0,35 g de CsCl/ml a la suspensió (amb això obtenim una densitat de 1,3 g/ml). Ajustem el volum final a 20 ml.

A continuació es prepara el gradient de CsCl per al rotor SV28 en tubs de plàstic de 36 ml. S'afegeix la mostra al fons (20 ml). Per la part de sota del tot s'afegeixen 9 ml de CsCl de 1.41 g/ml. Després, i també per sota, s'afegeixen 9 ml més de CsCl a 1.6 g/ml. Es centrifuga durant 24h a 27.000 rpm a 4°C

Un cop format el gradient el dia següent, es desfà mitjançant el PGF (formador de gradients) o mitjançant la punció amb una agulla per la part de sota i es recullen alíquotes d'1 ml consecutives.

Per tal de determinar quines fraccions contenen la major part de virus es fa una RT-PCR de les fraccions. Així doncs, es dilueix 1:1000 en aigua de cada fracció. Per a les reaccions s'utilitzen per pou: 2 µl d'una dilució 1/10 de la mostra, 12.5 ul de SyBGr, 1 µl d'encebador directe, 1ul d'encebador revers i 8.5 µl d'aigua. Les condicions de PCR són: 94°C durant 5 min, 25 cicles de 94°C 1 min, 52-53°C 1 min, 72°C 1 min i 10min a 72°C. (la temperatura d'unió pot variar depenent dels encebadors usats). Es seleccionen les alíquotes amb més expressió.

Per formar el segon gradient es col·loquen 1-2 ml de CsCl 1.6 g/ml sota del tub *ultra-clear* termosegellable. S'afegeixen totes les alíquotes desitjades i s'acaba d'enrasar amb CsCl 1.41g/ml (la capacitat total del tub és de 12.5ml). Es segellen els tubs i es centrifuguen o/n a 60000 rpm a 4°C amb un rotor Ty70.1. A continuació es recullen totes les fraccions en volums de 0,5 ml/fracció i es

torna a fer una RT-PCR amb les mateixes condicions per a seleccionar les alíquotes amb més quantitat de vectors AAV.

Les alíquotes desitjades s'ajunten fins a volums màxims de 2.5-3 ml per a la diàlisi. La diàlisi es fa en cassets de 10000 Da (Slide-A-Lyzer Dialiisis Products, Pierce, Rockford, USA) i amb PBS com a solució de diàlisi. Es fa una primera diàlisi d' 1 hora a temperatura ambient, seguit d'una segona diàlisi a les 2 hores. A continuació es fa l'últim canvi de PBS durant tota la nit a 4°C. El dia següent, es recullen els vectors virals i s'aliquoten segons la necessitat. Es va deixar sempre una alíquota amb volums petits per a la titració.

2.6.3. Titració de vectors AAVs.

El DNA de 2µl del vector viral s'aïlla mitjançant la digestió durant 1 hora amb solució de proteïnasa K a 37°C. Es deixa refredar i es porta a un volum de 120ul amb aigua estèril per minimitzar errors amb la manipulació. A continuació, s'extreu el DNA mitjançant una barreja de fenol-cloroform-alcohol isoamil (25:24:1). Es realitza una segona extracció amb cloroform-alcohol isoamil (24:1). S'afegeixen 8ul de glicogen (5 mg/ml, Ambion), 20 µl d'acetat sòdic 3M a pH=5.2 i 450 µl d'etanol absolut. Es precipita la barreja a -80°C durant 1 hora i es centrifuga a 4°C a velocitat màxima durant 20 minuts. Es renta el sediment obtingut amb etanol al 70% i es resuspen en tampó TE.

A continuació es fan diferents dilucions del DNA del vector viral amb solució de d'hibridació. Així mateix, es fan dilucions del plasmidi original per tal de fer una recta patró que cobreixi un espectre de 20 ng de DNA a 0,125 ng de DNA.

<u>Proteinasa K</u>	<u>Solució d'hibridació</u>
TRIS 1M pH=8	NaOH 0,4M
EDTA 0,5mM	25mM EDTA
proteïna K	0,00008% blau de bromotimol
10% SDS.	
H ₂ O Estèril	

A continuació, es talla una membrana (Biodyne B), s'humidifica amb aigua i es col·loca al *slot blot* (Perkin Elmer). Es carreguen les diferents mostres anteriorment diluïdes, així com la recta patró i s'aplica el buit a l'aparell. A partir d'aquest moment es prehibrida i s'hibrida amb una sonda específica tal i com s'ha explicat prèviament amb la realització del Northern Blot.

2.7. Inducció de diabetis experimental.

2.7.1. Inducció de la diabetis experimental en ratolins mitjançant la injecció de estreptozotocina.

L'estreptozotocina (STZ) és un antibiòtic que *deriva* d'*Streptomyces achromogenes*. la principal funció del qual és la destrucció de la cèl·lula β del pàncrees. Per la inducció de la diabetis experimental de ratolins, s'administrava una injecció intraperitoneal durant cinc dies consecutius, a una dosi de 45 mg de Stz per quilogram de pes corporal. La STZ es va dissoldre en una solució de tampó citrat sòdic 10 mM amb 0.9% NaCl, pH 4,5, immediatament abans de la seva administració. L'aparició de diabetis es va determinar mesurant els nivells de glucosa en sang.

2.7.2. Inducció experimental de diabetis en gossos mitjançant la injecció d'alloxan i Stz.

Aquest estudi va involucrar gossos beagle mascles, de tres a cinc mesos d'edat, que van ser obtinguts de la casa comercial Isoquimen (Barcelona) i van ser establats individualment en gosses convencionals de la Facultat de Veterinària, en acordança amb el Comitè d'Ètica i Experimentació Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona. Els gossos sans van ser alimentats una vegada al dia amb 300g d'una dieta seca convencional rica en proteïna, vitamines i minerals.

Al matí del dia de la inducció de diabetis, els gossos van ser alimentats i després dejunats la resta del dia. El mateix vespre (de 12 a 14 hores en dejú) els gossos són injectats intravenosament per la vena cefàlica amb una barreja d'una solució de 40mg/kg d'Alloxan i una solució de 35 mg/kg d'STZ. Les dues drogues van ser preparades al moment en condicions asèptiques com a solucions contenint 100 mg/ml en tampó fosfat trisòdic (pH=4,5) i esterilitzades per filtració amb un filtre de 0,22 µm.

Aproximadament, 8h després del tractament amb la droga s'administrà al gos una solució salina al 5% de glucosa i suplementada també amb KCl 1M per prevenir la hipopotassèmia a través d'un catèter intravenós a la vena cefàlica. A partir d'aquest moment s'anaren mesurant els nivells de glucosa durant cada hora i s'ajustà el sèrum amb dextrosa en funció de la glucèmia, afegint, si calia, bolus de glucosa al 50% per prevenir la hipoglucèmia deguda a l'alliberament de la insulina causada per la destrucció de les cèl·lules β del pàncrees.

Aproximadament, al cap de 16 hores després de la inducció de diabetis els gossos s'alimentaren amb 100 grams de pinso/animal i acabaren normalitzant la glucèmia. En aquest moment es retornaren a la gossera. Els dies següents a la inducció de diabetis experimental s'anà seguint la glucèmia en dejú al mati fins a assolir dues mesures superiors a 250 mg/dl. En aquest moment, els gossos començaren a ser tractats amb insulina exògena CANIVET (especial gossos, insulina d'acció lenta) a una dosi de 0,3 U/kg cada 24 hores i començaren a ser alimentats amb una dieta especial per animals diabètics (Centauro tipus w/d (100 g/dia) o a/d (1 llauna/dia))

2.8. Injecció de vectors adenoassociats a múscul esquelètic.

2.8.1. Transferència d'AAV a múscul esquelètic de ratolins.

Per injectar l'AAV1 al múscul esquelètic els ratolins foren anestesiats mitjançant la injecció intraperitoneal de ketamina i xilacina. Les potes del darrere foren depilades per aïllar els músculs *tibialis anterior*, *gastrocnemius* i *quadriceps*. A continuació s'injectà 30 µl a cada múscul d'una solució que contenia el vector viral a la dosi pertinent diluït amb solució salina (NaCl 150ml) mitjançant la injecció directa amb una agulla d'insulina de 0,5 ml. L'animal es tornà a la gàbia i es controlà la recuperació de l'anestèsia.

2.8.2. Transferència d'AAV a múscul esquelètic de gossos.

2.8.2.1. Procediment d'anestèsia.

El gossos Beagle abans de l'anestèsia són premedicats amb Buprenorphina hydrochlorida (Buprex, Schering-Plough) amb una dosi de 0.01mg/kg intravenosa, fent servir un catèter (Vasocan[®], B. Braun) col·locat a la vena cefàlica de la pota davantera. Per induir l'anestèsia s'administrà una injecció intravenosa de Propolol (Propovet[®], B.Braun) a una dosi de 4 mg/kg i Valium (Diacapan[®]) a una dosi de 0,5 mg/kg. Els animals varen ser intubats i l'anestèsia es mantingué mitjançant la inhalació d'isofluorà en vapor al 2%, conjuntament amb un flux d'oxigen (150 ml/kg/min) en un sistema de respiració semiobert Bain. Durant tota la operació, els gossos varen estar mantinguts amb fluidoteràpia amb 10 mL/kg/h de Ringer lactat.

2.8.2.2. Injecció intramuscular de vectors AAV a múscul esquelètic.

A continuació, un cop adormit l'animal, es depilà la zona del múscul on s'havien de fer les injeccions intramusculars. El vector viral es diluí en solució salina estèril en volums de 2.5 ml, i s'injectà mitjançant un sistema multiinjector de 5 agulles MesoRAM (Biotekne SRL, Italy) amb un volum de 0.5 ml per lloc d'injecció. La dosi utilitzada va ser de 2.5×10^{12} vg/Kg. Es realitzaren les injeccions seriadades a diferents llocs del múscul. La recuperació de l'anestèsia fou a la sala de preoperatori i es portà directament a la gossera un cop recuperat del tot.

2.9. Test de tolerància a la insulina.

El test de tolerància a la insulina és un prova que té com a objectiu comprovar si els animals són capaços de disminuir la concentració de glucosa en sang després d'una administració exògena d'insulina. Abans de la administració de l'hormona es va determinar la glucèmia basal dels ratolins controls i dels ratolins tractats amb STZ. Posteriorment, es va injectar intraperitonealment una dosi de 0.75U d'insulina (Humulina Regular, Lilly S.A.) per quilo de pes viu. A partir d'aquest moment es van realitzar extraccions de sang seriades cada 15 minuts fins la finalització de l'experiment.

2.10. Test de tolerància a la glucosa.

Aquest test s'utilitza amb la finalitat de comprovar si els animals són capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de glucosa. Aquells animals que mantenien les glucèmies més elevades i no recuperaven els nivells basals de glucosa eren considerats diabètics.

Als animals se'ls va fer un control de glucèmia basal amb 5 µl de sang. La mesura de la glucèmia es feia amb el Glucometer Elite™ (Bayer). En el cas dels ratolins se'ls injectava intraperitonealment una dosi de 1 mg o de 3 mg de glucosa per gram de pes. A partir d'aquest moment es van fer extraccions de sang seriades per la vena caudal fins a les 2 hores de l'inici del test.

En el cas dels gossos, se'ls donava amb una sonda via oral una dosi de 30g/kg de glucosa en una solució de glucosa al 50%. A partir d'aquest moment, se'ls mesurava la glucèmia als temps indicats.

2.11. Determinació dels paràmetres sèrics.

2.11.1. Determinació de Glucosa.

Els nivells de glucosa sèrica es varen determinar a partir de 5 µl de sang total d'animals sagnats per la cua en el cas de ratolins i per la vena cefàlica en el cas dels gossos. La concentració es mesurava mitjançant el sistema Glucometer Elite TM de Bayer. En el cas d'animals dejunats es deixaven durant 16 hores sense menjar abans de la determinació.

2.11.2. Determinació d'insulina i de Pèptid C.

Per obtenir sèrum de ratolí els animals eren sacrificats per decapitació i immediatament es recollia la sang. En el cas dels gossos, la sang es recuperava a través de la vena cefàlica. En ambdós casos, el sèrum s'obtenia després de deixar coagular la sang durant 30 min i centrifugar a 4°C durant 20 minuts a 6.000 rpm. El sèrum es mantenia congelat (a -20°C) fins el moment de la determinació dels diferents paràmetres.

Els nivells totals d'insulina final es va determinar per RIA en el sèrum dels animals (CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvette, França). El mètode té un límit de sensibilitat de 30 pM i una variació intra-assaig del 6%. Per analitzar les

insulinèmies murines a diferents temps es va fer servir el Rat Insulin Elisa Kit (Christalchem, EEUU) el qual presenta una reactivitat creuada del 100% amb la insulina de ratolí, seguint el protocol del fabricant.

La determinació del contingut pancreàtic d'insulina es va fer a partir d'homogenats de pàncrees en 20 volums de solució etanol àcida (75% EtOH: 1,4% HCl). El pàncrees fou extret de l'animal, es pesà i es submergí en la solució etanol àcida prèviament refredada a 4°C. Les mostres es mantingueren en gel fins que foren homogeneïtzades. A continuació s'incubaren a 4°C en agitació suau durant 20-24h. Posteriorment, es centrifugaren a 5.000 rpm durant 15 minuts. Finalment, es recullí el sobrenedant i es mantingué a -20°C fins al moment de la determinació de l'hormona. Abans de la determinació de la insulina les mostres havien de ser diluïdes (1/500) amb un tampó fosfat La insulina es determinà per radioimmunoassaig, emprant el mateix kit que s'utilitzà per la determinació dels nivells sèrics d'insulina. Els resultats són expressats en relació al pes del pàncrees.

Solució Tampó fosfat: pH 7.5 per 500 mL

Na₂HPO₄·12H₂O 14.5 g

NaH₂PO₄·H₂O 2.7 g

ClNa 9.6 g

BSA 7.5 g

Amb 500 mL H₂O destil·lada, (la composició pot variar lleugerament mentre es mantingui el pH, la molaritat total i la proporció de BSA).

Els nivells de pèptid C humà es varen determinar mitjançant RIA (Linco Research, Missouri, USA) de mostres de sèrum congelat mitjançant el protocol del fabricant

2.12. Anàlisi histològica.

2.12.1 Anàlisi histològica del pàncrees.

Per a l'estudi dels illots pancreàtics es va realitzar l'anàlisi immunohistoquímica per insulina. Els pàncrees, tant de ratolí com de gos, van ser extrets i fixats amb formalina durant 24h. A continuació es van incloure en blocs de parafina i es van disseccionar. Les seccions van ser incubades durant tota la nit a 4°C amb un anticòs guinea porc anti-insulina de porc (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA), fent una dilució 1:100. Com a anticòs secundari es va usar un anticòs de conill anti-guinea porc immunoglobulina G, lligat a la peroxidasa (Roche Molecular Biochemicals). Com a substrat comogènic es va fer servir 3'3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma, St- Louis, MO). Les seccions varen ser contratenyides en solució d'hematoxilina de Mayer.

2.12.2. Anàlisi histològica del múscul tractat amb GFP.

Per a la detecció de GFP, els músculs obtinguts foren immediatament fixats en una solució tamponada de formol al 10% durant 24–48 hores a 4°C. A continuació, s'inclogueren en parafina i s'obtingueren seccions (2-3 µm), que posteriorment es desparafinaren. La detecció d'expressió de GFP al múscul

esquelètic de gos o de ratolí va ser analitzada *in toto* al tibialis anterior mitjançant microscopia de fluorescència al cap d'una setmana després de l'administració de vector AAV1-GFP. L'Expressió de GFP a les seccions de múscul va ser determinada fent servir un anticòs de conill anti-GFP (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) diluït a 1:500. Com a anticòs secundari es va usar un anticòs de cabra biotinilat anti-conill i complex ABC (Vector, Burlingame, CA).

2.12.3 Anàlisi histològica del múscul esquelètic amb hematoxilina-eosina.

Per estudiar la morfologia dels músculs tractats amb AAV, els talls es tenyiren amb hematoxilina, es rentaren, i posteriorment es tenyeiren de nou amb eosina. A continuació les mostres es deshidrataren i s'aclariren per, a continuació, muntar els portaobjectes i visualitzar-los al microscopi de camp clar.

2.12.4 Anàlisi histològica de les terminacions nervioses.

Els coixinets plantars es van disseccionar sota una lupa Leica M50 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar Germany) i es van deixar en paraformaldehid al 4% a 4°C durant 6 hores. A continuació, es van immernir en solució de Zamboni durant 24 hores, i després es van introduir en solució de sacarosa al 30% a 4°C en PBS 0.1M (pH 7.2) durant 24h més. Per últim, es van congelar els coixinets en OCT i es van guardar a -20°C fins el moment de processar les mostres.

Els coixinets plantars es van tallar a 50 μ m amb un criòstat (Leica CM1510), obtenint-se entre 15 i 20 talls, i es van deixar a -20°C en solució anticongelant d'Olmos. En el moment de començar les immunohistoquímiques es van fer dos rentats amb PBS (pH 7.4) de 30 minuts cadascun. Seguidament es van fer dos rentats més de 30 minuts en PBS amb un 5% de triton-X 100 (Merck, Darmstadt, Alemanya), i llavors es va procedir a bloquejar les unions inespecífiques deixant els coixinets durant 2 hores en solució de bloqueig [PBS i triton-X 100 amb un 2% de sèrum normal de cabra (Sigma St. Louis, MS)]. Després es van incubar amb l'anticòs primari policlonal contra PGP 9.5 (1:500, Ultracclone Limited, Isle of Wight England, UK) durant 72 hores a 4°C diluït en solució de bloqueig. Es van fer 4 rentats de 30 minuts cadascun amb PBS (pH 7.4) i triton-X 100 i tot seguit es van incubar amb l'anticòs secundari *Cy3 goat anti-rabbit IgG* (1:200, Amershan Biosciences, Piscataway, NJ) durant 36 hores a 4°C. Abans de començar amb els rentats, es van deixar temperar els coixinets durant 1 hora i llavors es van fer 2 rentats de 30 minuts amb PBS (pH 7.4) i triton-X 100 i dos rentats de 30 minuts amb PBS (pH 7.4). Finalment, els teixits es van col·locar sobre els portaobjectes pretractats (DakoCytomaton, Glostrup, Dinamarca), es van deshidratar i es van muntar amb DPX (Surgipath, UK). Les mostres es van analitzar amb un microscopi d'epifluorescència Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Tokio, Japó) equipat amb un filtre G-2A (excitació verda 510-560 nm, emissió 590 nm vermella).

2.13 Determinació del consum d'aigua i de menjar.

Es va pesar el menjar i es va mesurar el volum d'aigua inicial dels menjadors i abeuradors en els animals individualitzats. Al cap d'una setmana es va a tornar a pesar el menjar i a mesurar l'aigua. La diferència de les dues mesures es va dividir entre set i s'obtingué el volum d'aigua o el pes de menjar per dia i per ratolí.

2.14 Càlcul estadístic.

Els resultats s'expressen com la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana (S.E.M.). Les diferències significants van ser determinades usant la *t*-student de les dades no aparellades, considerant significant $p < 0,05$.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. (1993). The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* **329**, 977-986.
- ABAI, A.M., HOBART, P.M., and BARNHART, K.M. (1999). Insulin delivery with plasmid DNA. *Hum Gene Ther* **10**, 2637-2649.
- ANDERSON HR, STITT AW, GARDINER TA, LLOYD SJ, ARCHER DB. (1993). Induction of alloxan/streptozotocin diabetes in dogs: A revised experimental technique. *Lab Anim*. **27**:281-285
- ANDERSON, W.F. (1998). Human gene therapy. *Nature* **392**, 25-30.
- AOKI, Y., CIOCA, D.P., ODAIRA, 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**, 96-102.
- ARRUDA VR, FIELDS PA, MILNER R, WAINWRIGHT L, DE MIGUEL MP, DONOVAN PJ, HERZOG RW, NICHOLS TC, BIEGEL JA, RAZAVI M, DAKE M, HUFF D, FLAKE AW, COUTO L, KAY MA, HIGH KA. (2001). Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther*. **4**(6):586-92.
- ARRUDA, V.R., SCHUETTRUMPF, J., HERZOG, R.W., NICHOLS, T.C., ROBINSON, N., LOTFI, Y., MINGOZZI, F., XIAO, W., COUTO, L.B., and HIGH, K.A. (2004). Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* **103**, 85-92.
- ATKINSON, M.A., and LEITER, E.H. (1999). The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med* **5**, 601-604.
- AYUSO E, CHILLON M, GARCIA F, AGUDO J, ANDALUZ A, CARRETERO A, MONFAR M, MOYA M, MONTANE J, OTAEGUI PJ, BOSCH F. (2006). In vivo gene transfer to healthy and diabetic canine pancreas. *Mol Ther*, **13**(4):747-55.
- BENNETT, S.T., LUCASSEN, A.M., GOUGH, S.C., POWELL, E.E., UNDLIEN, D.E., PRITCHARD, L.E., MERRIMAN, M.E., KAWAGUCHI, Y., DRONSFIELD, M.J., POCIOT, F., and ET AL. (1995). Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* **9**, 284-292.
- BLANKINSHIP, M.J., GREGOREVIC, P., ALLEN, J.M., HARPER, S.Q., HARPER, H., HALBERT, C.L., MILLER, D.A., and CHAMBERLAIN, J.S. (2004). Efficient

- transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther* **10**, 671-678.
- BLACK HE, ROSENBLUM IY, CAPEN CC. (1980) Chemically induced diabetes mellitus in the dog. *Am J Path.* **98**:295-305
- BLACKLOW, NR (1988) Adeno-associated virus of humans; in Pattison, JR (ed): *Parvoviruses and Human Disease*. Boca Raton, CRC Press, pp 165-174.
- BLAU, H.M., and SPRINGER, M.L. (1995). Gene therapy--a novel form of drug delivery. *N Engl J Med* **333**, 1204-1207.
- BOLLI, G.B., DI MARCHI, R.D., PARK, G.D., PRAMMING, S., and KOIVISTO, V.A. (1999). Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia* **42**, 1151-1167.
- BOTTINO R, LEMARCHAND P, TRUCCO M, GIANNOUKAKIS N. (2003) Gene- and cell-based therapeutics for type 1 diabetes mellitus. *Gene Ther.* **10**(10):875-89.
- BRANGE, J. (1997). The new era of biotech insulin analogues. *Diabetologia* **40**, 48-53.
- BROWNLEE, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-820.
- BURCELIN, R., PRINTZ RL, KANDE J, ASSAN R, GRANNER DK, GIRARD J. (1993). Regulation of glucose transporter and hexokinase II expression in tissues of diabetic rats. *Am J Physiol* **265**(3 Pt 1): E392-401.
- CHANG, P.Y., JENSEN, J., PRINTZ, R.L., GRANNER, D.K., IVY, J.L., and MOLLER, D.E. (1996). Overexpression of hexokinase II in transgenic mice. Evidence that increased phosphorylation augments muscle glucose uptake. *J Biol Chem* **271**, 14834-14839.
- CHAO, H., LIU, Y., RABINOWITZ, J., LI, C., SAMULSKI, R.J., and WALSH, C.E. (2000). Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther* **2**, 619-623.
- CHAO, H., MONAHAN, P.E., LIU, Y., SAMULSKI, R.J., and WALSH, C.E. (2001). Sustained and complete phenotype correction of hemophilia B mice following intramuscular injection of AAV1 serotype vectors. *Mol Ther* **4**, 217-222.
- CHENUAUD, P., LARCHER, T., RABINOWITZ, J.E., PROVOST, N., CHEREL, Y., CASADEVALL, N., SAMULSKI, R.J., and MOULLIER, P. (2004). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* **103**, 3303-3304.
- CHEUNG AT, DAYANANDAN B, LEWIS JT, KORBUTT GS, RAJOTTE RV, BRYERASH M, BOYLAN MO, WOLFE MM, KIEFFER TJ. (2000). Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* **290** (5498): 1959-62.

- CRYSTAL, R.G. (1995). Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* **270**, 404-410.
- DAVALLI, A.M., NAPOLI, R., WEITGASSER, R., CAPOTORTO, J.V., HIRSHMAN, M.F., FINEGOOD, D.T., BONNER-WEIR, S., HORTON, E.S., and WEIR, G.C. (1996). Long-term normalization of GLUT-4 protein content in skeletal muscle of diabetic rats following islet transplantation. *J Endocrinol* **150**, 255-263.
- DE FRONZO, R.A. (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetic genes. *Diab.Rev.* **5**, 177-269. *Ramiya 2000 reversal nat. Med.*
- 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**, 12979-12984.
- DIMITRIADIS, G.D., and GERICH, J.E. (1983). Importance of timing of preprandial subcutaneous insulin administration in the management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **6**, 374-377.
- DOIRON B, CUIF MH, KAHN A, DIAZ-GUERRA MJ. (1994) Respective roles of glucose fructose , and insulin in the regulation of the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. *J Biol Chem* **269**:10213-216.
- DONG H, ALTOMONTE J, MORRAL N, MESECK M, THUNG SN, WOO SL.. (2002). Basal insulin gene expression significantly improves conventional insulin therapy in type 1 diabetic rats. *Diabetes* **51**(1): 130-8.
- DUBERNARD, J.M., LEFRANCOIS, N., MARTINENGI, S., MARTIN, X., FINAZ DE VILLAIN, J., MARECHAL, J.M., and GELET, A. (1989). [Results of the treatment of type I insulin-dependent diabetes mellitus with pancreatic transplant]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*, 125-131.
- DURING, M.J., KAPLITT, M.G., STERN, M.B., and EIDELBERG, D. (2001). Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* **12**, 1589-1591.
- FALQUI, L., S. MARTINENGI, SEVERINI GM, CORBELLA P, TAQLIETTI MV, ARCELLONI C, SARUGERI E, MONTI LD, PARONI R, DOZIO N, POZZA G, BORDIGNON C. (1999). Reversal of diabetes in mice by implantation of human fibroblasts genetically engineered to release mature human insulin. *Hum Gene Ther* **10**(11): 1753-62
- FERBER, S., HALKIN, A., COHEN, H., BER, I., EINAV, Y., GOLDBERG, I., BARSHACK, I., SEIJFFERS, R., KOPOLOVIC, J., KAISER, N., and KARASIK,

- A. (2000). Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* **6**, 568-572.
- FERRE T, PUJOL A, RIU E, BOSCH F, VALERA A. (1996). Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (14): 7225-30.
- FERRE T, RIU E, FRANCKHAUSER S, AGUDO J, BOSCH F. (2003). Long-term overexpression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance. *Diabetologia*. **46**(12) 1662-8.
- FIELD, L.L. (2002). Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia* **45**, 21-35.
- FLODSTROM-TULLBERG, M., YADAV, D., HAGERKVIST, R., TSAI, D., SECREST, P., STOTLAND, A., and SARVETNICK, N. (2003). Target cell expression of suppressor of cytokine signaling-1 prevents diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* **52**, 2696-2700.
- FLOTTE, T., CARTER, B., CONRAD, C., GUGGINO, W., REYNOLDS, T., ROSENSTEIN, B., TAYLOR, G., WALDEN, S., and WETZEL, R. (1996). A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther.* **7**, 1145-1159.
- FLOTTE, T.R., AFIONE, S.A., and ZEITLIN, P.L. (1994). Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**, 517-521.
- FLOTTE, T.R., BRANTLY, M.L., SPENCER, L.T., BYRNE, B.J., SPENCER, C.T., BAKER, D.J., and HUMPHRIES, M. (2004). Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther* **15**, 93-128.
- FLOTTE TR. (2004). Immune response to recombinant adeno-associated virus vectors: putting preclinical findings into perspective. *Hum Gen Ther.* **15**:716-7
- FURTADO LM, SOMWAR R, SWEENEY G, NIU W, KLIP A. (2002) Activation of the glucose transport GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol.* **80**(5).579-78
- GAO, G.P., ALVIRA, M.R., WANG, L., CALCEDO, R., JOHNSTON, J., and WILSON, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11854-11859.
- GERSTEIN, H.C. (1994). Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* **17**, 13-19.
- GORUS, F.K., and PIPELEERS, D.G. (2001). Prospects for predicting and stopping the development of type 1 of diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **15**, 371-389.

- GOUDY, K.S., BURKHARDT, B.R., WASSERFALL, C., SONG, S., CAMPBELL-THOMPSON, M.L., BRUSKO, T., POWERS, M.A., CLARE-SALZLER, M.J., SOBEL, E.S., ELLIS, T.M., FLOTTE, T.R., and ATKINSON, M.A. (2003). Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. *J Immunol* **171**, 2270-2278.
- GOUDY K, SONG S, WASSERFALL C, ZHANG C, KAPTURCZAK M, MUIR A, POWERS M, SCOTT-JORGENSEN M, CAMBPELL-THOMPSON M, CRAWFORD JM, ELLIS TM, FLOTTE TR, ATKINSON MA. (2001) Adeno-associated virus vector-mediated IL-10 gene delivery prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci*. **98**, 13913-18
- GREELISH, J.P., SU, L.T., LANKFORD, E.B., BURKMAN, J.M., CHEN, H., KONIG, S.K., MERCIER, I.M., DESJARDINS, P.R., MITCHELL, M.A., ZHENG, X.G., LEFEROVICH, J., GAO, G.P., BALICE-GORDON, R.J., WILSON, J.M., and STEDMAN, H.H. (1999). Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat Med* **5**, 439-443.
- GROS L., MONTOLIU, RIU E, LEBRIGAND L, BOSCH F. (1997). Regulated production of mature insulin by non-beta-cells. *Hum Gene Ther* **8(18)**: 2249-59.
- GROS, L., RIU, E., MONTOLIU, L., ONTIVEROS, M., LEBRIGAND, L., and BOSCH, F. (1999). Insulin production by engineered muscle cells. *Hum Gene Ther* **10**, 1207-1217.
- GROSKREUTZ, D.J., SLIWKOWSKI, M.X., and GORMAN, C.M. (1994). Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J Biol Chem* **269**, 6241-6245.
- HAO, E., TYRBERG, B., ITKIN-ANSARI, P., LAKEY, J.R., GERON, I., MONOSOV, E.Z., BARCOVA, M., MERCOLA, M., and LEVINE, F. (2006). Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med* **12**, 310-316.
- HAUCK B, XEN L, XIAO W. (2003) Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol Ter*, **7(3)**:419-25.
- HEISE T, KAPITZA C, HOMPESECH M, HEINEMANN L. (2005). Inhaled insulin as alternative delivery system for subjects with diabetes-A literature review. *Av Diabetol*. **21**:91-102
- HEROLD, K.C., HAGOPIAN, W., AUGER, J.A., POUMIAN-RUIZ, E., TAYLOR, L., DONALDSON, D., GITELMAN, S.E., HARLAN, D.M., XU, D., ZIVIN, R.A., and

- BLUESTONE, J.A. (2002). Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **346**, 1692-1698.
- HERZOG RW, YANG EY, COUTO LB HAGSTROM JN, ELWELL D, FIELDS PA, BURTON M, BEELLINGER DA, READ MS, BRINKHOUS KM, PODSAKOFF GM, NICHOLS TC, KURTZMAN GJ, HIGH KA. (1999). Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med* **5**:56-63.
- HOUWING, H., HILBRANDS, L.G., VAN SUYLICHEM, P.T., BRUGGINK, J.E., STEFFENS, A.B., and STRUBBE, J.H. (1997). Control of insulin secretion and glucose homeostasis in exercising diabetic rats with intrasplenic or kidney subcapsular islet grafts. *Cell Transplant* **6**, 413-422.
- HUGHES SD, JOHNSON JH, QUADE C, NEWGARD CB. (1993). Transfection of AtT-20ins cells with GLUT-2 but not GLUT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. Relationship to glucose metabolism. *J Biol Chem* **268**(20): 15205-12.
- IDO, Y., VINDIGNI, A., CHANG, K., STRAMM, L., CHANCE, R., HEATH, W.F., DIMARCHI, R.D., DI CERA, E., and WILLIAMSON, J.R. (1997). Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science* **277**, 563-566.
- IONESCU-TIRGOVISTE, C. (1996). Insulin, the molecule of the century. *Arch Physiol Biochem* **104**, 807-813.
- IYNEDJIAN, P. B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* **293**(Pt 1): 1-13.
- JAREMKO, J., and RORSTAD, O. (1998). Advances toward the implantable artificial pancreas for treatment of diabetes. *Diabetes Care* **21**, 444-450.
- JIN, Y., QU, A., WANG, G.M., HAO, J., GAO, X., and XIE, S. (2004). Simultaneous stimulation of Fas-mediated apoptosis and blockade of costimulation prevent autoimmune diabetes in mice induced by multiple low-dose streptozotocin. *Gene Ther* **11**, 982-991.
- JUN, H.S., CHUNG, Y.H., HAN, J., KIM, A., YOO, S.S., SHERWIN, R.S., YOON, J.W. (2002). Prevention of autoimmune diabetes by immunogene therapy using recombinant vaccinia virus expressing glutamic acid decarboxylase. *Diabetologia* **45**, 668-676.
- KHAN, B. B. (1992). Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest* **89**(5): 1367-74.
- KASPAR, B.K., ROTH, D.M., LAI, N.C., DRUMM, J.D., ERICKSON, D.A., MCKIRNAN, M.D., and HAMMOND, H.K. (2005). Myocardial gene transfer and long-term

- expression following intracoronary delivery of adeno-associated virus. *J Gene Med* **7**, 316-324.
- 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**, 33-40.
- KAY, M.A., MANNO, C.S., RAGNI, M.V., LARSON, P.J., COUTO, L.B., MCCLELLAND, A., GLADER, B., CHEW, A.J., TAI, S.J., HERZOG, R.W., ARRUDA, V., JOHNSON, F., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W., and HIGH, K.A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* **24**, 257-261.
- KESSLER, P.D., PODSAKOFF, G.M., CHEN, X., MCQUISTON, S.A., COLOSI, P.C., MATELIS, L.A., KURTZMAN, G.J., and BYRNE, B.J. (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14082-14087.
- KIM, K.S., KANG, Y., CHOI, S.E., KIM, J.H., KIM, H.M., SUN, B., JUN, H.S., and YOON, J.W. (2002). Modulation of glucocorticoid-induced GAD expression in pancreatic beta-cells by transcriptional activation of the GAD67 promoter and its possible effect on the development of diabetes. *Diabetes* **51**, 2764-2772.
- KOJIMA, H., FUJIMIYA, M., MATSUMURA, K., YOUNAN, P., IMAEDA, H., MAEDA, M., and CHAN, L. (2003). NeuroD-beta-cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* **9**, 596-603.
- KONIGSRAINER, A., TILG, H., REIBNEGGER, G., STEURER, W., SCHMID, T., WACHTER, H., and MARGREITER, R. (1992). Pancreatic juice neopterin excretion--a reliable marker of pancreas allograft rejection. *Transplant Proc* **24**, 907-908.
- LAMOTHE, B., BAUDRY, A. DESBOIS P, LAMOTTE L, BUCCHINI D, ME MEYTS P, JOSHI RL. (1998). Genetic engineering in mice: impact on insulin signalling and action. *Biochem J* **335**;193-204.
- LANDGRAF, R. (1996). Impact of pancreas transplantation on diabetic secondary complications and quality of life. *Diabetologia* **39**, 1415-1424.
- LEE HC, KIM SJ, KIM KS, SHIN HC, YOON JW. (2000). Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* **408**(6811): 483-8.
- LIPES, M.A., COOPER, E.M., SKELLY, R., RHODES, C.J., BOSCHETTI, E., WEIR, G.C., and DAVALLI, A.M. (1996). Insulin-secreting non-islet cells are resistant to autoimmune destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8595-8600.

- LIU Y, MINGOZZI F, RODRIGUEZ-COLON S, JOSEPH S, DOBRZYNSKI E, SUZUKI T, HIGH KA, HERZOG RW (2004). Therapeutic levels of factor IX expression using a muscle-specific promoter and adeno-associated virus serotype 1. *Hum Gen Ther*, **15**:783-792.
- LOMBARDI, A. M., MOLLER D., LOIZEAU M, GIRARD J, LETURQUE A . (1997). Phenotype of transgenic mice overexpressing GLUT4 and hexokinase II in muscle. *Faseb J* **11**(13): 1137-44.
- LOUBOUTIN JP, WANG L, WILSON JM. (2005) Gene transfer into skeletal muscle using novel AAV serotypes. *J Gene Med*. Apr;**7**(4):442-51.
- LOWE, W.L. (1998) Diabetes Mellitus: principles of molecular medicine. Chapter 47. J.L. Jameson ed. 433-442.
- MANDARINO, LJ, PRINTZ RL, CUSI KA, KINCHINGTON P, O'DOHERTY RM, OSAWA H, SEWELL C, CONSOLI A, GRANNER DK, DE FRONZO RA (1995). Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle. *Am J Physiol* **269**:701-8.
- MANNING, W.C., ZHOU, S., BLAND, M.P., ESCOBEDO, J.A., and DWARKI, V. (1998). Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 477-485.
- MANNO, C.S., CHEW, A.J., HUTCHISON, S., LARSON, P.J., HERZOG, R.W., ARRUDA, V.R., TAI, S.J., RAGNI, M.V., THOMPSON, A., OZELO, M., COUTO, L.B., LEONARD, D.G., JOHNSON, F.A., MCCLELLAND, A., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W., KAY, M.A., HIGH, K.A., and GLADER, B. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood*. **101**, 2963-2972.
- MANNO CS, PIERCE GF, ARRUDA VR, GLADER B, RAGNI M, RASKO JJ, OZELO MC, HOOTS K, BLATT P, KONKLE B, DAKE M, KAYE R, RAZAVI M, ZAJKO A, ZEHNDER J, RUSTAGI PK, NAKAI H, CHEW A, LEONARD D, WRIGHT JF, LESSARD RR, SOMMER JM, TIGGES M, SABATINO D, LUK A, JIANG H, MINGOZZI F, COUTO L, ERTL HC, HIGH KA, KAY MA. (2006) Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*. Mar;**12**(3):342-7.
- MARTINENGI S, CUSELLA DE ANGELIS G, BIRESSI S, AMADIO S, BIFARI F, RONCAROLO MG, BORDIGNON C, FALQUI L. (2002) Human insulin production and amelioration of diabetes in mice by electrotransfer-enhanced plasmid DNA gene transfer to skeletal muscle. *Gene Ther* **9**:1429-1437.

- MAS A. Tesis doctoral (2004): Aproximacions de teràpia gènica per a la diabetis mellitus centrada en la manipulació genètica del múscul esquelètic. Universitat Autònoma de Barcelona.
- MAS, A., MONTANE, J., ANGUOLA, X.M., MUNOZ, S., DOUAR, A.M., RIU, E., OTAEGUI, P., and BOSCH, F. (2006). Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* **55**, 1546-1553.
- MATSCHINSKY FM: Banting lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* **45**:223-241.
- MATSCHINSKY FM, MAGNUSON MA, ZELENNT D, JETTON TL, DOLIBA N, HAN Y, TAUB R, GRIMSBY J. (2006) The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes*. **55**: 1-12
- MATSUSHITA, T., ELLIGER, S., ELLIGER, C., PODSAKOFF, G., VILLARREAL, L., KURTZMAN, G.J., IWAKI, Y., and COLOSI, P. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* **5**, 938-945.
- MENDOLA, J.F., CONGET, I., MANZANARES, J.M., COROMINOLA, H., VINAS, O., BARCELO, J., and GOMIS, R. (1997). Follow-up study of the revascularization process of purified rat islet beta-cell grafts. *Cell Transplant* **6**, 603-612.
- MEYER S, HOPNER W, SEITZ HJ:(1991). Transcriptional and post-transcriptional effects of glucose on liver phosphoenolpyruvate-carboxykinase gene expression *Eur J Biochem* **202**:985-991.
- MITANCHEZ, D., CHEN R., MASSIAS JF, PORTEU A, MIGNON A, BERTAGNA X, KAHN A. (1998). Regulated expression of mature human insulin in the liver of transgenic mice. *FEBS Lett* **421**(3): 285-9.
- MIYAZAKI, S., YAMATO, E., and MIYAZAKI, J. (2004). Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* **53**, 1030-1037.
- MOSS, R.B., RODMAN, D., SPENCER, L.T., AITKEN, M.L., ZEITLIN, P.L., WALTZ, D., MILLA, C., BRODY, A.S., CLANCY, J.P., RAMSEY, B., HAMBLETT, N., and HEALD, A.E. (2004). Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* **125**, 509-521.
- MOUNTAIN, A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* **18**, 119-128.
- MORRAL N, MCEVOY R, DONG H, MESECK M, ALTOMONTE J, THUNG S, WOO SL. (2002). Adenovirus-mediated expression of glucokinase in the liver as an adjuvant treatment for type 1 diabetes. *Hum Gene Ther* **13**(13): 1561-70.

- MUECKLER, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* **219**, 713-725.
- MULLIGAN, R.C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* **260**, 926-932.
- MUZZIN, P., EISENSMITH, R.C., COPELAND, K.C., and WOO, S.L. (1997). Hepatic insulin gene expression as treatment for type 1 diabetes mellitus in rats. *Mol Endocrinol* **11**, 833-837.
- NAPOLI, R., DAVALLI, A.M., HIRSHMAN, M.F., WEITGASSER, R., WEIR, G.C., and HORTON, E.S. (1996). Islet transplantation under the kidney capsule fully corrects the impaired skeletal muscle glucose transport system of streptozocin diabetic rats. *J Clin Invest* **97**, 1389-1397.
- NAPOLI R, HIRSHMAN MF, HORTON ES. (1995). Mechanisms and time course of impaired skeletal muscle glucose transport activity in streptozocin diabetic rats. *J Clin Invest* **96**(1): 427-37.
- NELSON RW, COUTO C. (2003). *Small animal internal medicine*. 3rd Edition. Ed. Mosby.
- NORRIS, J.M., and SCOTT, F.W. (1996). A meta-analysis of infant diet and insulin-dependent diabetes mellitus: do biases play a role? *Epidemiology* **7**, 87-92.
- OHASHI N, ISAJI S, KAWARADA Y, MIZIMOTO R, HIBASAMI H, NAKASHIMA K. (1991) Effect of insulin treatment on the regeneration of the remnant pancreas after major pancreatectomy in dogs. *Int J Pancreatol.* **9**:165-70
- OTAEGUI P. J. FERRE T. PUJOL A., RIU E, JIMENEZ R, BOSCH F.(2000). Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia. *Hum Gene Ther* **11**(11): 1543-52.
- OTAEGUI P. J., ONTIVEROS M. RIU E., JIMENEZ R, BOSCH F.(2002). Glucose-regulated glucose uptake by transplanted muscle cells expressing glucokinase counteracts diabetic hyperglycemia. *Hum Gene Ther* **13**(18): 2125-33.
- PICKUP J., WILLIAMS, G. (1997) *Textbook of Diabetis*. Blackwell Science Ltd.
- PILKIS SJ, GRANNER DK. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann Rev Physiol*, **54**:885-909.
- PIPELEERS, D., KEYMEULEN, B., CHATENOU, L., HENDRIECKX, C., LING, Z., MATHIEU, C., ROEP, B., and YSEBAERT, D. (2002). A view on beta cell transplantation in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* **958**, 69-76.
- PRINTZ, R. L., KOCH S, POTTER LR, O'DOHERTY RM, TIESINGA JJ, MORITZ S, GRANNER DK. (1993). Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J Biol Chem* **268**(7): 5209-19.
- RABINOVITCH, A. (1998). An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* **14**, 129-151.

- RAMIYA, V.K., MARAIST, M., ARFORS, K.E., SCHATZ, D.A., PECK, A.B., and CORNELIUS, J.G. (2000). Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* **6**, 278-282.
- RAO, M.V., DONOGHUE, M.J., MERLIE, J.P., and SANES, J.R. (1996). Distinct regulatory elements control muscle-specific, fiber-type-selective, and axially graded expression of a myosin light-chain gene in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **16**, 3909-3922.
- REA, S., and JAMES, D.E. (1997). Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* **46**, 1667-1677.
- RERUP CC (1970). Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Phar Rev.* **22**:485-518
- RIU, E., MAS, A., FERRE, T., PUJOL, A., GROS, L., OTAEGUI, P., MONTOLIU, L., and BOSCH, F. (2002). Counteraction of type 1 diabetic alterations by engineering skeletal muscle to produce insulin: insights from transgenic mice. *Diabetes* **51**, 704-711.
- RIVERA, V.M., GAO, G.P., GRANT, R.L., SCHNELL, M.A., ZOLTICK, P.W., ROZAMUS, L.W., CLACKSON, T., and WILSON, J.M. (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* **105**, 1424-1430.
- RIVIERE, C., DANOS, O., and DOUAR, A.M. (2006). Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther.* **13**-17-1300-8
- ROBERTSON DG, MARINO EM, THULE PM, SENEVIRATNE CK, MURPHY LJ (1994) Insulin and glucocorticoids regulate IGFBP-1 expression via a common promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:226-232.
- RYAN, E.A., PATY, B.W., SENIOR, P.A., BIGAM, D., ALFADHLI, E., KNETEMAN, N.M., LAKEY, J.R., and SHAPIRO, A.M. (2005). Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* **54**, 2060-2069.
- SAMULSKI, R.J., CHANG, L.S., and SHENK, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* **63**, 3822-3828.
- SEGEV, H., FISHMAN, B., ZISKIND, A., SHULMAN, M., and ITSKOVITZ-ELDOR, J. (2004). Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells* **22**, 265-274.
- SHAPIRO, A.M., and LAKEY, J.R. (2000). Future trends in islet cell transplantation. *Diabetes Technol Ther* **2**, 449-452.

- SHIFRIN AL, AURICCHIO A, YU QC, WILSON J, RAPER SE. (2001). Adenoviral vector-mediated insulin gene transfer in the mouse pancreas corrects streptozotocin-induced hyperglycemia. *Gen Ther* **8**, 1480-89.
- SONG, S., GOUDY, K., CAMPBELL-THOMPSON, M., WASSERFALL, C., SCOTT-JORGENSEN, M., WANG, J., TANG, Q., CRAWFORD, J.M., ELLIS, T.M., ATKINSON, M.A., and FLOTTE, T.R. (2004). Recombinant adeno-associated virus-mediated alpha-1 antitrypsin gene therapy prevents type I diabetes in NOD mice. *Gene Ther* **11**, 181-186.
- SORIA, B., SKOUDY, A., and MARTIN, F. (2001). From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* **44**, 407-415.
- SRIVASTAVA, C.H., SAMULSKI, R.J., LU, L., LARSEN, S.H., and SRIVASTAVA, A. (1989). Construction of a recombinant human parvovirus B19: adeno-associated virus 2 (AAV) DNA inverted terminal repeats are functional in an AAV-B19 hybrid virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8078-8082.
- STEEPER RS, SVITEK CA, CHAPMAN S, GREENBAUM LE, TAUB R, O'BRIEN RM. (1997). A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucos-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J Biol Chem* **272**:11689-701.
- STEPTOE, R.J., RITCHIE, J.M., and HARRISON, L.C. (2003). Transfer of hematopoietic stem cells encoding autoantigen prevents autoimmune diabetes. *J Clin Invest* **111**, 1357-1363.
- STEWART C., TAYLOR NA, et al. (1994). Insulin-releasing pituitary cells as a model for somatic cell gene therapy in diabetes mellitus. *J Endocrinol* **142**(2): 339-43.
- THULE PM., LIU J, PHILLIPS LS. (2000). Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes. *Gene Ther* **7**(3): 205-14.
- THULE PM, LIU J (2000). Regulated insulin gene therapy of STZ-diabetic rats. *Gen Ther.* **7**, 1774-52
- TRUCO M. (2005). Regeneration of the pancreatic beta-cells. *J Clin Invest*, **115**:5-12.
- URABE, M., DING, C., and KOTIN, R.M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* **13**, 1935-1943.
- VALERA A, FILLAT C, COSTA C, SABATER J, VISA J, PUJOL A, BOSCH F. (1994). Regulated expression of human insulin in the liver of transgenic mice corrects diabetic alterations. *Faseb J* **8**(6): 440-7.
- WAHREN, J., EKBERG, K., JOHANSSON, J., HENRIKSSON, M., PRAMANIK, A., JOHANSSON, B.L., RIGLER, R., and JORNVALL, H. (2000). Role of C-peptide in human physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E759-768.

- WANG, Z., ZHU, T., QIAO, C., ZHOU, L., WANG, B., ZHANG, J., CHEN, C., LI, J., and XIAO, X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* **23**, 321-328.
- WARRINGTON, K.H., JR., and HERZOG, R.W. (2006). Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* **119**, 571-603.
- WATANABE D, NAKARA H, AKAGI K, ISHII T, MIZUGUCHI H, NAGASHIMA Y, OKANIWA A. (2004) Oral glucose tolerance test and determination of serum fructosamine level in beagle dogs. *Jou Toxic Sci* **29**. 1:33-36
- WHITE M. F. and KAHN RC. (1994). The insulin signaling system. *J Biol Chem* **269**(1): 1-4.
- WONG, F.S., KARTTUNEN, J., DUMONT, C., WEN, L., VISINTIN, I., PILIP, I.M., SHASTRI, N., PAMER, E.G., and JANEWAY, C.A., JR. (1999). Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med* **5**, 1026-1031.
- WRIGHT, E.M., TURK, E., ZABEL, B., MUNDLOS, S., and DYER, J. (1991). Molecular genetics of intestinal glucose transport. *J Clin Invest* **88**, 1435-1440.
- XIAO, W., CHIRMULE, N., BERTA, S.C., MCCULLOUGH, B., GAO, G., and WILSON, J.M. (1999). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* **73**, 3994-4003.
- XIAO, X., LI, J., and SAMULSKI, R.J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* **70**, 8098-8108.
- 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**, 2224-2232.
- YOON, J.W., and JUN, H.S. (2001). Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* **928**, 200-211.
- ZEKZER, D., WONG, F.S., AYALON, O., MILLET, I., ALTIERI, M., SHINTANI, S., SOLIMENA, M., and SHERWIN, R.S. (1998). GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J Clin Invest* **101**, 68-73.
- ZIMMET, P., ALBERTI, K.G., and SHAW, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782-787.
- ZOLOTUKHIN, S., BYRNE, B.J., MASON, E., ZOLOTUKHIN, I., POTTER, M., CHESNUT, K., SUMMERFORD, C., SAMULSKI, R.J., and MUZYCZKA, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* **6**, 973-985.