

**FACULTAT DE VETERINÀRIA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**APROXIMACIONS DE TERÀPIA GÈNICA PER A LA DIABETIS
MELLITUS CENTRADES EN LA MANIPULACIÓ GENÈTICA
DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC**

ALEXANDRE MAS MONTEYS

Memòria presentada pel llicenciat ALEXANDRE
MAS MONTEYS 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.

ALEXANDRE MAS MONTEYS

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

Setembre de 2003

BARCELONA

Pels meus pares i germans. Per donar-me dia a dia el vostre amor, dedicació, paciència, alguna bronca de tant en tant, i l'ajuda necessària per tirar endavant. I perquè us estimo.

AGRAÏMENTS

No seria just presentar aquest treball sense donar el meu més sincer agraïment a totes aquelles persones que durant tots aquests anys han participat d'una manera o altra en la realització d'aquest treball. Espero no deixar-me a ningú, però per si de cas, moltes gràcies per endavant.

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Fàtima Bosch, per acceptar-me durant tots aquests anys en el seu grup, per la seva dedicació i direcció del que ha estat la meva recerca.

Voldria donar les gràcies molt especialment a en Joel i en Xavi per la seva amistat. I pel seu ajut durant tot el temps que hem treballat junts. Sense vosaltres moltes de les coses haurien tardat molt temps per a que fossin enllestides.

Al Dr. Efrén Riu per ensenyar-me moltes de les tècniques utilitzades en aquest treball.

Voldria donar les gràcies al Dr. Miguel Chillón per tot el que he après d'ell, per estar disposat a escoltar-me i per fer-me veure que les coses sempre poden ser molt més senzilles. Ja saps que tenim pendent una cervesa, eh?

A la Vicky i la Dra. Mónica George. Què dir-vos que no sapiguen ja? Heu estat molt per mi durant aquests anys, i espero que encara que ens separem la nostra amistat es mantingui. Gràcies per tot el vostre ajut, i els vostres consells, tant dins com fora de la feina, us estimo molt noies. Vicky, estava equivocada al principi: Sí hay pa tanto!
Mónica: aún tenemos pendiente la segunda parte del lago de los cisnes, no?

A Martita, por los cines y cenas que hemos compartido, por inspirarme (tu ya me entiendes!), por ser tan sincera (también me entiendes!) y por ser mi amiga. Y también por todas las inmunos.

A la resta de gent que ha treballat amb mi en el laboratori i ha fet més amena la convivència en ell: A la Dra. Alba Casellas, per saber interpretar i entendre el meu do de la paraula, ja m'agradaria estar com tu a la teva edat! (Ho sento però havia de dir-

ho). A l'Ariana, per la teva energia i per la teva alegria. Encara que altres et diguin bitxo això es méu! A la Maria per les sempre interessants xerrades a l'estabulari. A la Dra. Sylvie Franckhauser por estar ahí siempre que la necesitaba. A la Dra. Tura Ferre i la seva inquietud per saber coses noves. (Per cert, a veure si anem a fer més cafès al bar). A l'Antonio per tenir sempre una frase divertida quan es necessita. Al Sergi per la paciència d'esperar-me al laboratori per baixar a Barcelona, a l'Edu i a la Judith per estar sempre disposats a participar quan se'ls necessita. Al Miquel García per estar sempre a punt per a discutir de ciencia..... o no..... però que és motiu d'estudi! Al Dr. Pedro Otaegui por ser tan claro con tus comentarios y por tu "Avisados quedais". A la Mireia per donar-me un cop de mà quan feia falta.

A l'equip de microinjecció: A la Dra. Anna Pujol perquè com ja saps "tu rai que totes et ponen". A l'Anna Arbós i les seves nenes (en tens tres, no? I dues són bessones?) A l'Ainara pels bons moments que hem passat i també al Carles i a la Ivet per estar sempre a punt per donar-te un cop de mà.

Als companys del 205, la Dra. Mercè Monfar per tenir les paraules adequades en el moment oportú, a la Dra. Assumpció Bosch per respondre tots els meus dubtes i ajudar-me quan ho necessitava. Al Raül per les seves converses a l'hora de dinar. I també a les noves incorporacions: en Dr. Jose Piedra i a la Dra. Susana Miravet.

Al Carles Ros, per tenir sempre una solució per a tot, encara que moltes vegades t'ho he posat difícil. A l'Anna Vilalta, per no tenir mai un no, i el seu ànim a que tot surti bé, i com no per estar disposada a parlar del Barça quan faci falta.

Als companys del mateix replà a l'Ernesto, l'Ivan, l'Amparo, la Raquel, la Loli, la Maria, Las Quintanillas., la Montse, la Clelia, la Laia, la Maria José,... per estar disposats sempre a escoltar-me, fer sopars...

Al Dr. Joaquim Ariño, a la Dra. Anna Bassols i al Dr. Nèstor Gómez per la seva ajuda i el seu tracte cordial.

A la Rosa, la Montse, el Fede, la Carme i l'Ester per tenir sempre una solució en tots els problemes administratius que sovint em superen i no entenc.

A l'Ariadna per la paciència que vas tenir mentre vas estar treballant amb nosaltres. A la Magda per la teva amistat i per tots els sopars fets a Sant Martí, a la Sandra i els "Ivans" per les excursions per Catalunya. A la Núria per ser el meu terronet de sucre. Al Josep Maria, per aparèixer en el lloc indicat en el moment més oportú. A la Mar, l'Oriol, la Sandra (perdó la Clara), l'Òscar i al Josep pels sopars a Gràcia i les nits al Quiz. Al Jordi Montané i a l'Anna, algun dia montarem la nostra empresa, o si no ja organitzarem alguna altra cosa.

Als doctors que han marxat del laboratori o del departament, però que d'una manera o altre m'han ensenyat moltes coses de la ciència: Al Laurent, al Jean Christophe, i la Nathalie Bruni. I també a la Malika Touab, al Lluís Montoliu, al Manolo Romarís, al Pep Clotet, al Francesc Posas, al Xavi Gregori i la Gemma Pascual.

Aquest treball ha estat possible gràcies en primer lloc a la beca predoctoral del Ministeri de Educació i Cultura. Les investigacions han estat finançades pel Ministerio de Ciencia i Tecnologia, I+D: (CICYT: SAF96-0270; SAF99-0094; SAF2002-20389; FEDER 2FD97-1984). A la Fundación Ramón Areces. A la Red de grupo del Instituto de Salud Carlos III: "Defectos metabólicos y moleculares en la diabetes mellitus y sus complicaciones. terapia génica y celular. Diabetes mellitus y sus complicaciones" (G03/212), a la CIRIT (1999SGR 00101; 2001SGR 00195). I a la Fundació la Marató de TV3 (992710).

ABREVIATURES

DNA	Àcid desoxiribonucleic
GLUT	Transportador de glucosa
HK	Hexoquinasa
GS	Glucogen sintasa
DM1	Diabetis mellitus de tipus 1
DM2	Diabetis mellitus de tipus 2
HLA	Regió d'antígens leucocitaris humans
LADA	Latent autoimmune diabetis of adults
DZ	Dizigòtics
MZ	Monozigòtics
MHC	Complex major d'histocompatibilitat
VNTR	Nombre variable de repeticions en tàndem
NOD	Non obese diabetic
GAD	Àcid glutàmic descarboxilasa
RNA	Àcid ribonucleic
CMV	Citomegalovirus
EBV	Epstein-Barr virus
EMC	Encefalomiocarditis
KRV	Virus de kilham de rata
BSA	Albúmina sèrica bovina
Baf A1	bafilomycina A1
Stz	estreptozotocina
APC	Cèl.lula presentadora d'antigen
NK	Natural killer
IL-1β, 12, 2, 10, 4	Interleuquina 1 β , 12, 2, 10, 4
TNF-α, β	Factor de necrosis tumoral- α
INF-γ	Interferó- γ
Tc	Limfòcits T citotòxics.
Th 1/2	Limfòcits T helper 1/2
TCR	Receptor de cèl.lules T
SPF	Establació lliure de patògens
RIP	Promotor del gen de la insulina de rata

NAD+/ NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid oxid/red.
NO	Òxid nítric
SPF	Estabulari lliure de patògens
RIP	Promotor del gen de la insulina de rata
Stz	Streptozotocina
MLDStz	Múltiples baixes dosis de streptozotocina
ACTH	Hormona adrenocorticotropina
LPK	Priruvat kinasa hepàtica.
S14	Spot 14
PEPCK	Fosfoenol piruvat carboxiquinasa
G6Pasa	Glucosa -6 fosfatasa
GIRE	Element regulable induïble per glucosa
IGFBP-1	Insulin-like growth-factor-binding protein
MLC	Cadena lleugera de la miosina
GK	Glucoquinasa
Km	Constant Michaelis-mentem
Tg Ins+GK	Doble transgènic insulina més glucoquinasa
Tg Ins	Transgènic insulina
Tg GK	Transgènic glucoquinasa
cDNA	DNA copia
LB	Medi Luria-Bertrani
GFP	Proteïna verda fluorescent
β-Gal	β-galactosidasa
BS	Bluescript
rRNA	RNA ribosòmic
g	Grams
Vol	Volum
ml	Mililitre
SDS	Dodecil sulfat de sodi
TAE	Tampó Tris-acetat-EDTA
EDTA	Etilendiaminotetraacetat.
TE	Tampó Tris-EDTA
ssDNA	DNA de esperma de salmó
dATP	Desoxiadenosina-5'-trifosfat

dCTP	Desoxicitosina-5'-trifosfat
dGTP	Desoxiguanina-5'-trifosfat
dTTP	Desoxitimidina-5'-trifosfat
NEFA	Àcid greixós no esterificat
PMSF	Fluorur de fenilmetil sulfonil
HEPES	4-(2-hidroxiètil)-1-piperacina etanosulfat
2-DG	2-[1-H]deoxi-D-glucosa

ÍNDIX

I. PRESENTACIÓ	1-2
II. INTRODUCCIÓ	3-37
1. CONTROL DE LA HOMEOSTASI DE LA GLUCOSA.	3
2. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC	4-6
2.1 Paper del múscul esquelètic en la homeostasi de la glucosa.	4
2.2. Estructura del múscul esquelètic.	5
3. LA DIABETIS MELLITUS.	7-8
4. LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 1.	9-22
4.1. Factors genètics.	10
4.2. Factors Ambientals.	12
4.2.1. <i>Infeccions Virals.</i>	12
4.2.2. <i>Factors de la dieta.</i>	13
4.2.3. <i>Toxines.</i>	14
4.2.4. <i>Estrés.</i>	14
4.3. Patogènesi.	15
4.3.1. <i>Iniciació de la diabetis de tipus 1.</i>	15
4.3.2. <i>Tipus cel·lulars implicats en el desenvolupament de la diabetis de tipus 1.</i>	16
4.3.3. <i>Mecanismes de destrucció de les cèl·lules β.</i>	18
4.4 Models animals per a l'estudi de la diabetis de tipus 1A.	20
4.4.1. <i>Models de diabetis espontànea: Ratolins NOD (non-obese diabetic).</i>	20
4.4.2. <i>Models de diabetis experimental: Tractament amb estreptozotocina (Stz).</i>	21
5. TRACTAMENT DE LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 1.	23-26
5.1. Teràpia substitutòria amb insulina.	23
5.2. Transplantament de pàncrees i illots.	25
5.2.1. <i>Transplantament de pàncrees.</i>	25
5.2.2 <i>Transplantament d'illots.</i>	25

6. TERÀPIA GÈNICA.	27-37
6.1. Introducció a la teràpia gènica.	27
<i>6.1.1. Vectors virals.</i>	28
<i>6.1.2. Vectors no virals.</i>	29
6.2. Teràpia gènica per la diabetis mellitus de tipus 1.	32
<i>6.2.1. Producció d'insulina per cèl·lules extrapancreàtiques.</i>	32
<i>6.2.2. Increment de la captació i utilització de glucosa per cèl·lules extrapancreàtiques.</i>	35
III. OBJECTIUS.	38
IV.RESULTATS.	39-74
PART I.OBTENCIÓ I ANÀLISI FENOTÍPIC DE RATOLINS DOBLE TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN EL GEN DE LA INSULINA I LA GLUCOQUINASA A MÚSCUL ESQUELÈTIC.	39-55
1.1.Obtenció de ratolins doble transgenics que expressen els gens quimèrics MLC/hIns i MLC/GK.	39
<i>1.1.1.Obtenció dels ratolins doble transgenics MLC/hIns+GK.</i>	39
<i>1.1.2. Anàlisi de l'expressió del transgen.</i>	41
<i>1.1.3. Corva de tolerància a la Glucosa.</i>	41
1.2. Efecte de la expressió d'insulina i glucoquinasa en el múscul esquelètic sobre el desenvolupament de diabetis en animals tractats amb estreptozotocina.	43
<i>1.2.1. Efecte de la coexpressió de la insulina i la glucoquinasa en el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica.</i>	43
<i>1.2.2. Els ratolins doble transgenics no desenvolupaven hipoglucèmia.</i>	46
<i>1.2.3. Estudi de la insulinèmia en els animals tractats amb Stz.</i>	47
<i>1.2.4. Estudi d'altres paràmetres sèrics en els animals tractats amb Stz.</i>	48
<i>1.2.5. Test de tolerància a la glucosa.</i>	49
<i>1.2.6. Consum d'aigua i menjar.</i>	50
<i>1.2.7. Efecte de l'expressió local d'insulina i glucoquinasa sobre el metabolisme de la glucosa en el múscul esquelètic.</i>	51
<i>1.2.8. Efecte de l'expressió d'insulina i glucoquinasa sobre el metabolisme hepàtic de la glucosa.</i>	53

PART II. DESENVOLUPAMENT D'UNA NOVA APROXIMACIÓ DE TERÀPIA GÈNICA NO-VIRAL PER LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 1.	56-74
2.1. Electrotransferència de DNA a múscul esquelètic.	56
2.1.1. <i>Comparació de les condicions d'electrotransferència.</i>	56
2.1.2. <i>Estudi del efecte de l'inducció de diabetis sobre l'eficiència de transferència de DNA a múscul esquelètic.</i>	61
2.2. Electrotransferència a múscul esquelètic dels gens quimèrics CMV/hIns i CMV/GK en animals tractats amb estreptozotocina.	62
2.2.1. <i>Evolució de la glucèmia.</i>	62
2.2.2. <i>Estudi de la insulinèmia en els animals tractats amb Stz.</i>	65
2.2.3. <i>Estudi d'altres paràmetres sèrics en els animals tractats amb Stz.</i>	66
2.2.4. <i>Test de tolerància a la glucosa.</i>	67
2.2.5. <i>Efecte de l'expressió d'insulina i glucoquinasa sobre el metabolisme de la glucosa en el múscul esquelètic d'animals tractats amb Stz.</i>	68
2.2.5.1. <i>Efecte de l'expressió d'insulina i glucoquinasa sobre l'expressió de gens claus del metabolisme muscular.</i>	69
2.2.5.2. <i>Efecte de l'expressió d'insulina i glucoquinasa sobre l'índex de captació de glucosa del múscul esquelètic.</i>	70
2.2.5.3. <i>Efecte de l'expressió d'insulina i glucoquinasa sobre la massa muscular modificada genèticament.</i>	71
2.2.6. <i>Efecte de l'expressió d'insulina i glucoquinasa pel múscul esquelètic sobre el metabolisme hepàtic en animals tractats amb Stz.</i>	72
2.2.7. <i>Evolució de l'increment del consum d'aigua i menjar i de pes corporal.</i>	73
V. DISCUSSIÓ	75-84
VI. CONCLUSIONS	85-86
VII. MATERIALS I MÈTODES.	87-104
MATERIALS.	87
1. ANIMALS	87
2. SOQUES BACTERIANES I VECTORS PLASMÍDICS.	87

3. REACTIUS DE TREBALL.	88
4. SONDES.	88
5. ANTICOSSOS.	88
MÈTODES.	89
1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE DNA.	89
1.1. Preparació DNA plasmídic.	89
1.2. Restricció enzimàtica de DNA.	90
1.3. Resolució i purificació de fragments de DNA.	90
1.3.1. <i>Gels d'agarosa.</i>	90
1.3.2. <i>Purificació dels fragments de DNA per gene-clean</i>	91
1.4. Construcció molècules híbrides de DNA	91
1.4.1. <i>Subclonatge.</i>	91
1.4.2. <i>Transformació de cèl·lules d' E. Coli.</i>	92
2. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE ANIMALS DOBLE TRANSGÈNICS.	92
2.1. Obtenció de DNA genòmic.	92
2.2. Detecció dels animals per Southern Blot.	93
3. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE RNA	95
3.1. Preparació de RNA total.	95
3.2. Electroforesis del RNA en gels desnaturalitzants d'agarosa/formaldèhid.	95
3.3. Anàlisi de RNA per "Northern blot" (hibridació DNA-RNA).	96
4. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA.	96
5. DETERMINACIÓ DEL CONSUM D'AIGUA I MENJAR.	97
6. INDUCCIÓ DE DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT LA INJECCIÓ DE ESTREPTOZOTOCINA.	97
7. DETERMINACIÓ DELS PARÀMETRES SÈRICS.	97
7.1. Determinació de glucosa.	98
7.2. Determinació de triglicèrids.	98
7.3. Determinació d'àcids greixosos no esterificats (NEFAS).	98
7.4. Determinació de β -hidròxid butirat.	98
7.5. Determinació d'insulina.	98
8. ESTUDI DEL METABOLISME DE LA GLUCOSA.	99
8.1. Determinació dels nivells totals de proteïna GLUT4 a múscul esquelètic.	99
8.1.1. <i>Procediment d'obtenció de membranes totals.</i>	99
8.1.2. <i>Determinació de la concentració de proteïnes.</i>	100

8.1.3. <i>Separació de proteïnes per electroforesi SDS-PAGE.</i>	101
8.2 Determinació de metabòlits.	101
8.2.1. <i>Determinació de glucosa-6-fosfat.</i>	101
8.2.2 <i>Determinació de glucogen.</i>	102
8.3. Determinació de l'índex de captació de glucosa a múscul esquelètic.	102
9. ELECTROTRANSFERÈNCIA DE DNA A MÚSCUL ESQUELÈTIC.	103
10. ANÀLISI DE LA QUANTITAT DE PROTEÏNA β -GALACTOSIDASA EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC.	104
11. ANÀLISI HISTOLÒGIC DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC.	104
12. CÀLCULS ESTADÍSTICS.	104
VIII. BIBLIOGRAFIA.	105 - 114

La diabetis de tipus 1 és el resultat de la destrucció autoimmune de les cèl·lules β dels illots de Langerhans, la qual cosa dóna lloc a l'absència d'insulina. La disminució de les concentracions sèriques de l'hormona causa el desenvolupament d'hiperglucèmia. En tals casos, la teràpia substitutòria amb insulina és la més estesa. No obstant, aquesta resulta imperfecta, ja que els nivells circulants d'insulina que s'obtenen resten molt lluny dels nivells que observariem en cas d'un correcte funcionament de les cèl·lules β ; alhora que no evita l'aparició de greus complicacions secundàries associades. Alternativament a aquesta teràpia, doncs, s'han realitzat trasplantaments de pàncrees i illots. Aquestes aproximacions pretenen eliminar les injeccions diàries d'insulina; no obstant això, i donada la possible destrucció autoimmune dels illots trasplantats, els pacients requereixen immunosupressió crònica. A més, els donants són molt limitats i això fa que no puguin tractar-se un gran nombre de pacients. Per aquesta raó, actualment s'està investigant molt activament sobre el desenvolupament de noves aproximacions de teràpia gènica en el tractament d'aquesta malaltia.

El múscul esquelètic és el principal teixit responsable de l'eliminació de la glucosa després d'una ingesta. A causa de l'absència d'insulina en diabetis de tipus 1 el múscul és incapaç de captar la glucosa de la sang, el que contribueix al desenvolupament d'hiperglucèmia. Per altra banda, la capacitat del múscul esquelètic de produir proteïnes de manera sistèmica fa del múscul un teixit diana per a la producció de proteïnes terapèutiques.

Així doncs, 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, gràcies a la utilització del promotor del gen de la cadena lleugera de la miosina. Després de la inducció de diabetis experimental en aquests animals es van realitzar anàlisis dels paràmetres sèrics i estudis d'expressió gènica, de metabolisme hepàtic i muscular. Els resultats obtinguts mostraven que, a diferència dels ratolins control, els ratolins doble transgènics mostraven una normalització de les alteracions diabètiques. Això indicava que

l'expressió d'insulina i glucoquinasa podria constituir una nova aproximació de teràpia gènica per a la diabetis de tipus 1.

Entre els diferents vectors no virals per a transferir gens a múscul esquelètic, l'electrotransferència de DNA plasmídic en solució és un dels mètodes més atractius, ja que és de fàcil manipulació i d'elevada eficiència. En aquest treball, hem utilitzat unes condicions d'electrotransferència que permeten transfectar aproximadament el 80% de les fibres del múscul amb un elevat nivell d'expressió i un mínim de dany tissular.

Així doncs, per desenvolupar una nova teràpia per a la diabetis tipus 1 es van electrotransferir els gens de la insulina i la glucoquinasa als músculs *tibialis anterior*, *quadriceps* i *gastrocnemius* de ratolins diabètics. Després de l'electrotransferència, es va observar que l'expressió d'insulina i glucoquinasa per part dels músculs significava la normalització de la glucèmia, la recuperació dels nivells d'insulina circulants, així com un augment del metabolisme muscular i hepàtic de la glucosa, el qual contribuïa a millorar l'estat general de l'animal. En aquest sentit, al contrari dels ratolins diabètics control, els ratolins electrotransferits amb els gens de la insulina i la glucoquinasa van mostrar una normalització dels paràmetres sèrics, un major increment de pes corporal, una tolerància normal a una sobrecàrrega de glucosa i una normalització del consum de menjar i aigua.

Per tant, aquests resultats suggereixen que la manipulació genètica del múscul esquelètic per produir insulina i incrementar la captació i la utilització de glucosa mitjançant l'expressió de l'enzim hepàtic glucoquinasa, podria esdevenir una teràpia alternativa als tractaments actuals per a la diabetis de tipus 1.

1. CONTROL DE LA HOMEOSTASI DE LA GLUCOSA.

La glucosa és la principal font d'energia que utilitzen les cèl·lules. Aquest fet fa que la regulació de la seva concentració en sang sigui essencial per a l'organisme, ja que alteracions poden donar lloc a estats hiperglucèmics o hipoglucèmics extrems que poden esdevenir crítics per a la supervivència. La regulació de la concentració de glucosa en sang i, en últim terme, de l'equilibri energètic es realitza a través de la secreció coordinada d'insulina i glucagó per part del pàncrees. Aquestes hormones són claus en el control de la utilització i la producció de glucosa per part de l'organisme.

Durant el període postpandrial tenim tres processos que actuen sinèrgicament per a garantir el manteniment de l'homeostasi de la glucosa. En primer terme, l'estimulació de la producció i la secreció d'insulina per part de les cèl·lules β del pàncrees. En segon lloc, l'augment de la captació de glucosa per part dels teixits perifèrics (fetge, múscul i teixit adipós), promogut per l'increment dels nivells de glucosa i insulina en sang. I, en últim terme, la reducció de la producció hepàtica de glucosa, resultat de la inhibició de la secreció de glucagó en el pàncrees. En dejú, l'increment de glucagó i altres factors hormonals i nerviosos mantenen la normoglicèmia a través d'un increment de la producció hepàtica de glucosa mitjançant l'estimulació de la gluconeogènesi i de la glucogenolisi. Per tant, qualsevol alteració que afecti la funcionalitat de les cèl·lules β , del fetge, del múscul o del teixit adipós pot donar lloc a trastorns en l'homeostasi de la glucosa, al desenvolupament d'intolerància a la glucosa o, fins i tot, a diabetis mellitus (DeFronzo,1997).

El primer pas en la utilització de la glucosa per part de la cèl·lula és el transport del sucre a través de la membrana plasmàtica. Aquest procés és realitzat a través d'una família de proteïnes transportadores de glucosa (*GLUT1-GLUT5* i *GLUT7*) que estan estructuralment relacionades i que són producte de gens únics (Muecler,1994; Wright, 1991). Un cop a l'interior cel·lular, un grup de proteïnes citoplasmàtiques —les hexoquinases— s'encarregaran de dur a terme la fosforilació de la glucosa a glucosa-6-fosfat. Aquestes permetran que la glucosa incorporada dins la cèl·lula pugui ser metabolitzada cap a la formació de glucogen, o bé intervenir en diferents vies metabòliques com la glucòlisi o la via de les pentoses fosfat.

2. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC

2.1. El paper del múscul esquelètic en la homeostasi de la glucosa.

Entre els diferents teixits perifèrics implicats en la captació de glucosa, 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 glucosa per part del múscul esquelètic es realitza per difusió facilitada a través d'un transportador, de manera tant dependent com independent d'insulina. L'entrada de glucosa dins la cèl·lula muscular es realitza a través de les proteïnes transportadores GLUT4 i GLUT1. S'ha demostrat que el múscul expressa nivells relativament elevats de transportador GLUT4 (responsable del transport de glucosa estimulat per insulina) i nivells baixos de transportador GLUT1 (localitzat en la membrana plasmàtica i responsable de la captació basal de glucosa independent d'insulina). En condicions basals, el GLUT4 es localitza en vesícules intracel·lulars i es transloca a la membrana plasmàtica en resposta a insulina (Figura 1). Aquesta translocació sembla ser el principal mecanisme mitjançant el qual la insulina estimula la captació de glucosa per part del múscul (Rea & James, 1997).

Un cop dins la cèl·lula, la glucosa es ràpidament transformada en glucosa-6-fosfat a través de la reacció catalitzada per membres de la família de les hexoquinases. S'aconsegueix així que els nivells de glucosa intracel·lulars siguin inferiors als extracel·lulars i s'afavoreix l'entrada de glucosa dins la cèl·lula. Les hexoquinases I i II (HKI i HKII) són els isoenzims predominants en el teixit muscular. La HKII és responsable de la fosforilació de la glucosa en la captació estimulada per insulina. Tant l'activitat enzimàtica com els nivells de mRNA de HKII en el múscul esquelètic disminueixen quan els nivells d'insulina són baixos, o bé quan la senyal de la insulina està alterada. Tot això fa que la HKII, juntament amb el GLUT4, constitueixin el primer pas en la utilització de glucosa estimulada per 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. Estudis en animals transgènics que sobreexpressen HKII indiquen, almenys en condicions de hiperinsulinèmia i

hiperglucèmia, que la fosforilació de glucosa és el pas limitant en la captació de glucosa per part del múscul (Chang,1996)

La major part de la glucosa que entra a les fibres musculars en resposta a la insulina és convertida en glucogen per poder ser utilitzada en períodes de contracció (Figura 1). La glucogen sintasa (GS) és una enzima 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 estrictament el pas limitant per a la síntesi de glucogen (Mandarino, 1995). Els resultats obtinguts amb aquests animals recolzen la hipòtesi 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 síntesi de glucogen està alterada en diabetis tipus 2 i en individus predisposats a desenvolupar diabetis de tipus 2 (De Fronzo, 1997).

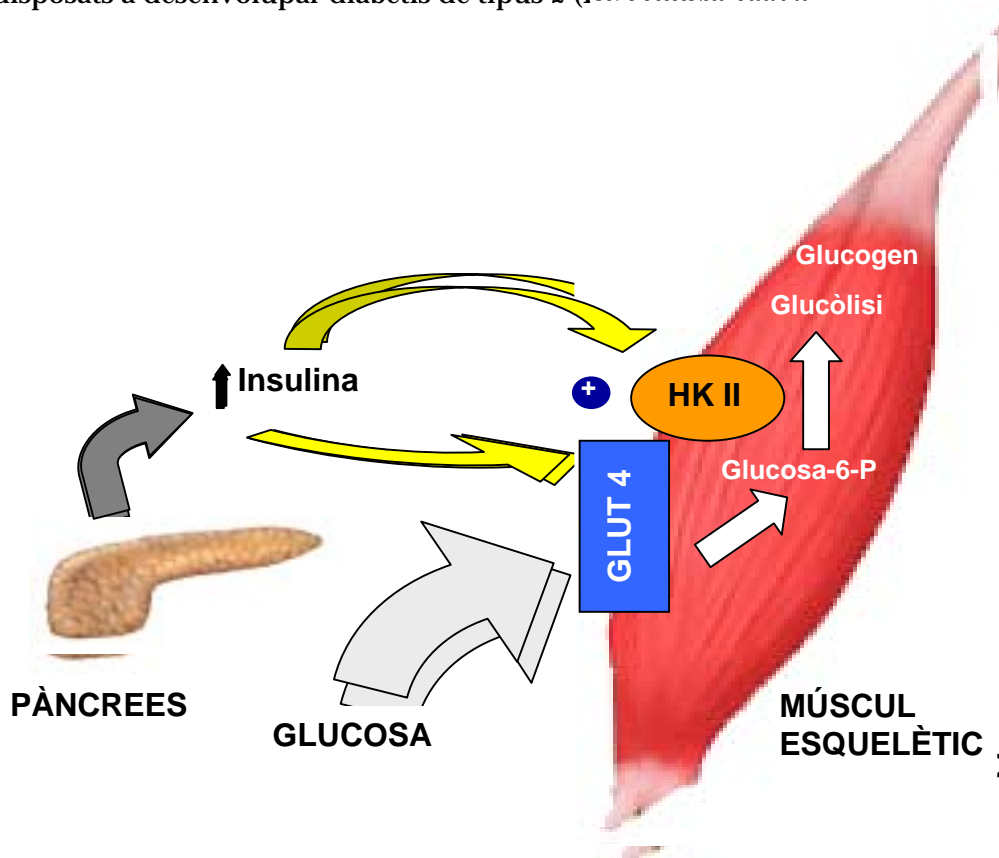


Figura 1. Paper del múscul esquelètic en la homeostasi de la glucosa. En situació postprandial, l'increment de la insulinèmia produïx un augment de la captació i la utilització de glucosa per part del múscul esquelètic. L'increment de la concentració d'insulina dóna lloc a la translocació del transportador de glucosa GLUT4 i a l'activació i sobreexpressió de la HKII. Un cop dins de la cèl·lula, la glucosa és convertida en glucosa-6-P i emmagatzemada en forma de glucogen o metabolitzada principalment cap a la via glucolítica.

2.2. Estructura del múscul esquelètic.

El múscul esquelètic és el responsable dels moviments de l'esquelet i de certs òrgans, com el globus ocular i la llengua. Aquest tipus de múscul també sol anomenar-se múscul voluntari ja que pot controlar-se de forma conscient. Estructuralment està constituït per les fibres musculars, les quals es mantenen unides entre sí per un teixit de col·lagen de sosteniment anomenat *endomisi*. Les fibres musculars són cèl·lules molt allargades, cilíndriques, contràctils, i que contenen nombrosos nuclis aplanats situats immediatament sota la membrana plasmàtica. Aquestes s'agrupen en feixos allargats anomenats fascicles, els quals també estan continguts en un altre teixit de col·lagen lax (perimisi). Quasi tots els músculs consten de molts fascicles i el conjunt de la massa muscular està envoltada 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).

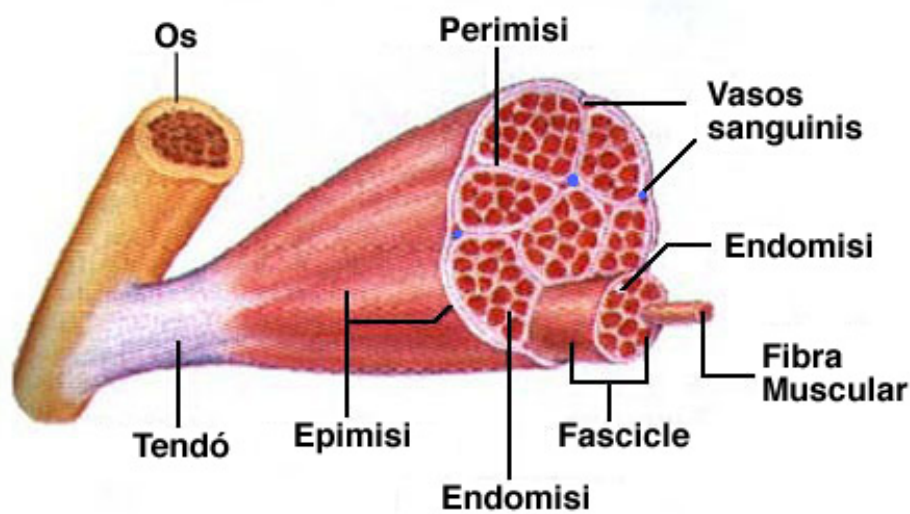


Figura 2. Estructura del múscul esquelètic.

Tot i tenir un aspecte general semblant, les fibres musculars són heterogènies, i es poden distingir en fibres de contracció lenta (tipus I) i ràpida (tipus II). Les necessitats metabòliques de cada fibra són diferents, de manera que les fibres lentes tenen un metabolisme aeròbic, mentre que el de les fibres ràpides serà preferentment anaeròbic. Les fibres de tipus I són petites transversalment i presenten un alt contingut mitocondrial. També posseeixen una elevada quantitat de mioglobina, fet que justifica el color vermell d'aquests tipus de fibra i que, a més a més, disposin d'una rica

irrigació sanguínia. Al contrari, les fibres de tipus II són més grans transversalment, tenen un baix contingut mitocondrial i la seva dotació de mioglobina es relativament escassa, igual que la seva irrigació. No obstant aquestes fibres són riques en glucogen i enzims glucolítics.

3. LA DIABETIS MELLITUS.

La diabetis mellitus engloba un grup de malalties metabòliques caracteritzades pel desenvolupament d'hiperglucèmia. Aquesta és el resultat d'un defecte en la secreció d'insulina, en l'acció de la insulina o per ambdues causes. Varis processos patogènics poden estar implicats en el desenvolupament de la diabetis. D'una banda, poden ser processos de naturalesa autoimmunitària contra les cèl·lules β del pàncrees que porten a la destrucció d'aquestes cèl·lules i donen lloc a una absoluta deficiència d'insulina. D'altra banda, la diabetis és el resultat d'anomalies produïdes tant en les cèl·lules productores d'insulina com en les cèl·lules diana de l'hormona, especialment en el múscul esquelètic, en el fetge i en el teixit adipós. Tals anomalies desencadenen l'aparició de resistència a l'acció de la insulina.

El desenvolupament d'hiperglucèmia crònica està associada tant a l'aparició dels símptomes clínics característics de la malaltia, com al desenvolupament de complicacions secundàries a llarg termini. Els símptomes clínics característics de la diabetis inclouen: poliúria, polidípsia, pèrdua de pes, i algunes vegades polifàgia i visió borrosa. També poden acompanyar la hiperglucèmia crònica alteracions en el creixement i susceptibilitat a certes infeccions.

Les complicacions secundàries estan associades a l'aparició de disfuncions i de fallides de varis òrgans a llarg termini; especialment en ulls, ronyons, nervis, cor i vasos sanguinis. Aquestes complicacions són: retinopatia amb pèrdua de visió; nefropatia que pot conduir a trastorns renals; neuropatia perifèrica amb risc de desenvolupar úlceres a peus i amputacions; neuropatia autònoma, que causa alteracions de tipus gastrointestinal, genitourinari i cardiovascular, així com disfuncions sexuals. Actualment, s'han proposat quatre mecanismes segons els quals la hiperglucèmia estaria relacionada amb el desenvolupament de les complicacions a llarg termini: (1)

increment de la via metabòlica del poliol, (2) increment del nivell de glucosilació de proteïnes i macromolècules intracel·lulars, (3) activació de la proteïna quinasa C i (4) increment de la via metabòlica de les hexosamines (Brownlee, 2001).

En els últims anys, s'ha observat que la incidència mundial d'aquest tipus de malaltia incrementa i que aquest augment pot estar lligat a canvis produïts en l'estil de vida de la societat. Es preveu que l'any 2010 la població diabètica hagi augmentat un 46% respecte al nombre de pacients observats en el 2000; és a dir, que es produeixi un increment de 150 a 220 milions de pacients amb diabetis (Zimmet 2001). Actualment, la diabetis de tipus 1 amb un 5-10%, i la diabetis de tipus 2 amb un 90-95% són les dues formes de diabetis que presenten major prevalença.

La diabetis de tipus 2 (DM2) apareix normalment en individus majors de 40 anys, tot i que actualment ja s'estan detectant un gran nombre de casos en nens (Ludwig, 2001). Aquest tipus de diabetis es caracteritza pel desenvolupament d'una resistència a l'acció de la insulina per part del fetge i dels teixits perifèrics (múscul i adipós), i/o una insuficient secreció d'insulina per part de les cèl·lules β pancreàtiques per tal de mantenir els nivells de glucosa en sang dins de la normalitat. La DM2 està relacionada amb una forta predisposició genètica, no obstant, aquesta és molt complexa i no està clarament definida. Múltiples interaccions gèniques i ambientals estan implicades amb el desenvolupament de la DM2, les quals determinaran si la malaltia tindrà lloc i a quina edat (Bell, 2001).

Els individus amb DM2 passen per una sèrie de fases abans que la diabetis es faci evident. Inicialment, els nivells d'insulina plasmàtica s'incrementen com a conseqüència de la resistència a l'hormona, però es manté l'euglicèmia. En una segona fase, la hiperglucèmia postpandrial està present malgrat la hiperinsulinèmia. I finalment, la secreció d'insulina disminueix davant la continua resistència a l'hormona i a causa, també, de la mort de les cèl·lules β . Això dóna lloc a una diabetis oberta (Lowe, 2001). En aquest tipus de diabetis també hi ha una alteració del metabolisme lipídic, produint-se un augment de la lipòlisi en el teixit adipós i un augment de la concentració d'àcids greixosos a nivell plasmàtic. No obstant, a diferència de la diabetis de tipus 1, en aquest cas no té lloc el desenvolupament d'una cetoacidèmia, almenys en estadis inicials.

La resistència a l'acció de la insulina per part dels teixits diana pot deure's a una disminució del nombre de receptors, així com a mutacions en el propi receptor que disminueixen la seva afinitat per l'hormona. D'igual manera, alteracions en la via de senyalització de la insulina també poden produir l'aparició de resistència (Bell, 2001).

Pel que fa al tractament, en estadis inicials els pacients amb diabetis de tipus 2 no depenen de l'aportació exògena d'insulina. Ara bé, poden arribar a requerir l'administració de l'hormona en estadis avançats de la malaltia sinó aconseguen controlar els nivells de glucosa en sang mitjançant la dieta o l'administració d'antidiabètics orals (Moller, 2001).

4. LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 1.

La diabetis de tipus 1 (DM1) es caracteritza per la pèrdua de les cèl·lules productores d'insulina. Segons quin sigui l'origen de la pèrdua de cèl·lules β parlem de diabetis de tipus 1 (DM1), o bé de diabetis de tipus 1 idiopàtica. La DM1 presenta una major incidència i és intercedida per un procés autoimmune contra les cèl·lules β pancreàtiques. La diabetis de tipus 1 idiopàtica presenta una incidència molt menor i es caracteritza per un fort component hereditari, no hi ha indicis de reacció autoimmunitaria contra les cèl·lules β i no està associada a la regió d'antígens leucocitaris humans (HLA).

La pèrdua de cèl·lules β condueix a una manca total d'insulina que dona lloc a hiperglucèmia i també a l'aparició de cetoacidèmia. L'absència d'insulina redueix la captació i la metabolització de glucosa per part del fetge i dels teixits perifèrics sensibles a la insulina (múscul, teixit adipós), la qual cosa incrementa els nivells de glucosa en sang. De la mateixa manera, els nivells sanguinis de glucagó són més elevats que els d'insulina; això incrementa la producció hepàtica de glucosa per l'activació de les vies metabòliques glucogenolítiques i gluconeogèniques. L'aparició de cetoacidèmia és el resultat de la mobilització d'altres substrats per obtenir energia. Els àcids greixosos es mobilitzen des del teixit adipós i són oxidats en el fetge per produir cossos cetònics els quals, quan s'alliberen a la sang, incrementen la seva concentració i donen lloc a una cetoacidèmia.

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

La DM1 és la segona malaltia infantil crònica més comuna —després de l'asma— a Europa i Nord Amèrica (Hawa, 2001). Generalment, és diagnosticada als joves i esdevé una de les formes més severes de la malaltia. Actualment, però, la incidència de DM1 diagnosticada a l'edat adulta és més elevada del que prèviament s'havia assumit. S'ha observat que individus diagnosticats inicialment com a DM2, en realitat desenvolupaven una forma de DM1 menys severa i amb una progressió molt més lenta anomenada “latent autoimmune diabetis of adults” (LADA) (Mathis 2001).

Els factors genètics i ambientals són determinants per a l'inici i la progressió del procés patològic de la DM1. Mentre que els factors genètics predisposen a desenvolupar la malaltia, els factors ambientals poden activar els diferents mecanismes autoimmunes en individus genèticament susceptibles.

4.1. Factors genètics.

Hi ha varies evidències que demostren que la DM1 presenta una base genètica:

1. La freqüència d'aparició de la malaltia és 15 vegades superior en aquell sector de població que presenta antecedents familiars de diabetis (població d'alt risc) que en la població general (6% població alt risc vs. 0,4% població general) (Thompson 1988, Spielman 1980).
2. El nivell de concordança de diabetis entre bessons dizigòtics (DZ) i monozigòtics (MZ), en els quals els factors ambientals abans i després del naixement són els mateixos, és més elevat en bessons MZ (Salvetti, 2000).
3. La freqüència d'aparició d'autoanticossos, els quals s'associen al risc de desenvolupar diabetis, són superiors en la població que presenta antecedents familiars de la malaltia. Estudis realitzats en bessons MZ i DZ han mostrat una freqüència d'aparició d'autoanticossos més elevada en el cas dels bessons MZ (Field, 2002).

Anàlisis realitzades en models murins i en humans demostren que la DM1 no és tractada d'una malaltia monogènica amb un patró hereditari típic mendelià, sinó que és un desordre complex i poligènic. Mitjançant anàlisi de lligament i anàlisi d'associacions, 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. Entre les diferents regions identificades, la *IDDM1* i la *IDDM2* són les que presenten una major contribució al desenvolupament de la malaltia (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 el complex major de histocompatibilitat (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). Les molècules de classe I s'expressen en la majoria de cèl·lules i són codificades per gens dins el locus HLA-A, -B, -C. Per contra, les molècules de classe II són expressades principalment en les cèl·lules presentadores d'antígens (macròfags, cèl·lules dendrítiques) i són codificades per gens dins dels locus HLA - DP, -DQ, -DR. Inicialment, es va determinar que el locus HLA-B de la regió del MHC de classe I era responsable del desenvolupament de la malaltia (Singal 1973). No obstant, estudis més recents han determinat que l'associació més important vindria donada per polimorfismes existents dins els locus HLA-DRBI, DQAI i DQBI en la regió de classe II. 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. La combinació dels al·lels DQAI*0501-DQBI*0201 i DQAI*0301-DQBI*0302, juntament amb els al·lels DRBI*03 i DRBI*04, és molt freqüent dins de la població caucàsica amb DM1. Tanmateix, s'ha observat que la presència dels al·lels DQAI*0102-DQBI*0602, DRBI*0403 i DRBI*0406 confereixen protecció enfront del desenvolupament de la malaltia. Varis estudis suggereixen que la presència o absència de certs aminoàcids en les cadenes DR β , DQ α i DQ β tindrien un paper important a l'hora de determinar la predisposició a la diabetis (Kelly 2001). La presència d'aquests tipus de gens predisposants també poden influenciar l'inici clínic de la malaltia. La freqüència de genotips d'alt risc HLA és menor en pacients diabètics LADA (Field 2002).

Estudis realitzats en individus caucàsics han mostrat una relació positiva entre certs polimorfismes dins la regió gènica de la insulina en el cromosoma 11p15.5 i el desenvolupament de DM1 (Bell 1984, Julier 1991, Bain 1992, Lucassen 1993). La influència d'aquest locus en el desenvolupament de la malaltia és del 10% i ha estat identificat com a *IDDM2*. Dins el locus de la insulina s'ha observat que, en la regió 5' flanquejant del gen de la insulina, hi ha una regió formada per un nombre variable de repeticions en tàndem (VNTR) constituïdes per un *core* de 14 a 15 pb, nombre de repeticions que estaria estretament relacionat amb aquesta associació (Bennet 1995). S'han identificat tres al·lels diferents en aquesta regió en funció del nombre de repeticions del tàndem: l'al·lel de classe I, que conté entre 34 i 45 repeticions i està associat a un major risc (entre 2 i 5 vegades superior) de desenvolupar la malaltia. L'al·lel de classe II, que té aproximadament 80 repeticions i la seva associació a la malaltia no ha estat clarament definida. I, finalment, l'al·lel de classe III, que conté entre 141 i 209 repeticions i s'ha observat que presenta un efecte protector dominant.

Alguns estudis suggereixen que la variació en el nombre de repeticions de la regió VNTR tindria un efecte modulador sobre el nivell d'expressió del gen de la insulina. En pàncrees fetals i adults s'ha observat que els al·lels de classe I estan associats a uns nivells de transcripció més elevats que en el cas dels al·lels de classe III, mentre que en el timus la relació seria inversa (Vafadis 1997, Pugliese 1997). Un elevat nivell d'expressió d'insulina en el timus facilitaria la inducció de la tolerància a l'hormona mitjançant la deleció de limfòcits T específics per a la insulina. Això, podria explicar l'efecte protector dels al·lels de classe III davant el desenvolupament de DM1. Tanmateix, un nivell reduït d'expressió d'insulina en el timus produiria que limfòcits T autoreactius per a la insulina no fossin deleccionats. Aquest fet, juntament amb l'elevada expressió d'insulina en el pàncrees en individus homozigòtics per l'al·lel de classe I incrementaria el risc de desenvolupar un procés d'autoimmunitat pancreàtica. En estudis realitzats a ratolins NOD (*non-obese diabetic*), en els quals s'incrementava l'expressió d'insulina a timus, s'ha observat una reducció en el desenvolupament de DM1 (French 1997).

4.2. Factors Ambientals.

Varies evidències suggereixen que els factors ambientals són importants en el desenvolupament de la malaltia ja que actuen sobre la penetrància dels gens susceptibles de diabetis:

1. L'àrea geogràfica pot ser determinant en el grau d'incidència de la malaltia en poblacions lingüísticament i ètnicament molt relacionades i amb un *background* genètic similar (p. ex. Finlàndia mostra una incidència de 35 casos per cada 100.000 habitants mentre que Estònia tan sols presenta una tercera part de la incidència del poble finès) (Zimmet, 2001).
2. El grau de concordança en el desenvolupament de diabetis en bessons monozigots és d'aproximadament el 50% (Salvetti, 2000).
3. Els gens susceptibles, que predisposen a un risc elevat de desenvolupar la malaltia —com alguns haplotips de la regió de HLA de classe II—, no manifesten una penetrància del 100% dins la població afectada.

S'ha especulat molt sobre quins poden ser els diferents factors ambientals que estan implicats en el desenvolupament de la diabetis de tipus 1. Entre els possibles candidats podem destacar: les infeccions virals, els factors de la dieta (alletament prematur amb llet de vaca, nitrosamines, vitamina D), les drogues (antibiòtics com la bafilomicina i la concanamycina A) i l'estrès (Zimmet 2001).

4.2.1. Infeccions Virals.

Els virus poden causar la destrucció de la cèl·lula β , bé per una interacció directa amb la pròpia cèl·lula β , bé induint de forma indirecta un atac autoimmunitari. Aquest últim podria ser motivat per varis mecanismes, com per exemple: (1) l'activació policlonal de limfòcits T, (2) l'existència d'una reacció creuada amb proteïnes cel·lulars en la resposta contra un antígen viral (*molecular mimicry*), (3) l'expressió de molècules de MHC en les cèl·lules diana, (4) l'expressió d'antígens amagats o la generació de neoantígens (Robles, 2001).

La infecció congènita amb el virus de la rubèola ha estat directament relacionada amb un increment en el risc de desenvolupar desordres autoimmunitaris. Es considera que el 20% dels infants amb rubèola congènita desenvoluparan DM1, o, fins i tot, altres malalties autoimmunitaries com la tiroiditis autoimmunitaria (Robles, 2001). Estudis recents

mostren que determinants antigènics existents en el virus de la rubèola i en l'àcid glutàmic descarboxilasa (GAD) poden ser reconeguts per les mateixes cèl·lules T de pacients amb DM1, el que suggereix que l'existència d'homologia molecular podria ser el mecanisme d'inducció de la malaltia (Ou, 2000).

També s'ha observat una associació entre el desenvolupament de DM1 i les infeccions enterovirals (Roivainen, 1998; Nairn, 1999; Sadeharju 2001). Mitjançant la tècnica de RT-PCR s'ha detectat la presència de RNA enteroviral en les cèl·lules sanguínies en un percentatge elevat de pacients diabètics recentment diagnosticats (Yin, 2002). Tot i que hi ha diversos virus de la família dels enterovirus que han estat implicats en el desenvolupament de DM1, molts estudis han trobat una associació directa amb la infecció amb *Cocci virus*. Els *Cocci virus* B4 i B5 han estat aïllats de pàncrees de pacients amb un inici agut de DM1. També s'ha observat que aquests virus són capaços d'induir diabetis en soques de ratolí susceptibles. Igualment, s'ha observat que la infecció amb el serotip B4 dona lloc a un increment de l'expressió de GAD 65 (Jaekel, 2002).

Altres virus que s'han relacionat amb el desenvolupament de DM1 són els citomegalovirus (CMV), els retrovirus i el virus d'Epstein-Barr (EBV). Aquests últims porten antigens específics que poden reaccionar a la cadena β de HLA-DQ (Classe II). De la mateixa manera, s'han identificat virus diabetogènics en ratolins i rates. El virus de la encefalomiocarditis (EMC) en ratolí i el virus de kilham (KRV) en rata. Ambdós infecten només a soques susceptibles (Jaekel, 2002).

4.2.2. Factors de la dieta.

Estudis epidemiològics en humans han associat un increment del risc de desenvolupar diabetis mellitus de tipus 1 a la substitució prematura de la llet materna per llet de vaca dins els tres primers mesos de vida (Gerstein, 1994; Norris 1996). S'ha suggerit que un elevat consum de llet de vaca durant la infantesa pot predisposar el nen al desenvolupament d'autoanticossos associats a la diabetis alhora que en promou la progressió (Virtanen, 1998). A més, estudis realitzats en models animals de diabetis espontània als qui s'administraven proteïnes de la llet mitjançant l'aigua de beguda, han mostrat que aquestes poden ser diabetogèniques (Johnson, 2000).

L'existència de certes regions d'homologia entre les proteïnes de la llet i els antigens de l'illot s'han relacionat amb el mecanisme a través del qual realitzarien el seu efecte immunològic. En període neonatal, l'intestí pot ser permeable al pas d'antigens a la sang i generar la producció d'anticossos. Entre les diferents proteïnes de la llet, l'albumina sèrica bovina (BSA) i la β -caseïna podrien ser responsables del desenvolupament de DM1 en humans i ratolins. Una resposta contra la BSA pot produir una reacció creuada amb components de la cèl·lula β . Existeix una regió dins de la proteïna BSA, anomenada ABBOS, que avarca des de l'aminoàcid 152 fins al 168, la qual presenta una elevada homologia amb la subunitat β de la proteïna DR i DQ del MHC de classe II (Schrezenmeir, 2000).

La ingestió de nitrosamines i una disminució del consum de vitamina D són altres factors de la dieta relacionats amb la patogeneïtat de la DM1. Les nitrosamines estan presents, normalment, en el 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 2001).

4.2.3. Toxines.

Petites quantitats de bafilomycina A1 (bafA1) poden causar una reducció de la tolerància a la glucosa i una alteració dels illots pancreàtics en ratolins (Myers, 2001). La BafA1 i les substàncies relacionades són produïdes per espècies de *Streptomyces*. Aquestes espècies són la font de la streptozotocina, un agent usat per a produir diabetis experimental en ratolins. Les *Streptomyces* són ubiqües en la terra i algunes poden infectar tubercles com patates o canya de sucre (Myers, 2001). D'aquí que una repetida exposició a la toxina produïda per les *Streptomyces* en la dieta podria ser diabetogènica en humans genèticament susceptibles.

4.2.4. Estrès.

L'estrès té un efecte cooperant més que promotor 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 1997).

4.3. Patogènesi.

En el desenvolupament de la DM1 podem distingir dues fases ben diferenciades: (1) insulinitis; quan una barreja de limfòcits i altres cèl·lules immunitàries envaeixen els illots, i (2) diabetis, quan la major part de les cèl·lules β han estat destruïdes i no hi ha prou producció d'insulina per regular els nivells de glucosa en sang, el que dona lloc a la hiperglucèmia (Thomas, 2000). Un cop iniciat el procés autoimmune contra els illots, el temps de progressió de la destrucció de les cèl·lules β pot ser més o menys ràpid. Hi ha individus en què el període d'insulinitis pot durar mesos, mentre que en altres casos poden passar anys abans que es desenvolupi una diabetis oberta (Kukreja, 1999).

4.3.1. Iniciació de la diabetis de tipus 1.

La patogènia de la DM1 s'ha estudiat extensament, no obstant, els mecanismes relacionats amb la iniciació i la progressió de la resposta immunitària encara no estan plenament identificats. En algun moment determinat, cèl·lules presentadores d'antígens (APC's) capten i processen autoantígens derivats de les cèl·lules β , els quals són posteriorment presentats a limfòcits T autoreactius. S'ha suggerit que aquest primer contacte entre els autoantígens i els limfòcits T es realitza en els nòduls limfàtics que drenen les cèl·lules β pancreàtiques. Una vegada preactivats, els limfòcits T es dirigeixen cap als illots, on, per segona vegada, es posen en contacte amb l'antigen; això els reactiva i desenvolupa la resposta immunitària (Mathis, 2001).

L'efecte d'algun factor ambiental o bé d'algun procés fisiològic produït al poc temps de néixer poden ser les causes de l'alliberament dels autoantígens, els quals són captats per les APC's. S'ha descrit que es produeix una onada d'apoptosi de cèl·lules β a les dues setmanes després del naixement, la qual pot estar associada a un procés de remodelació tissular (Trudeau, 2000). Igualment, la infecció de certs tipus de virus poden produir la lisi de les cèl·lules β infectades o un increment en la expressió d'autoantígens (Jaekel, 2002).

GAD65, insulina i IA-2 són els tres principals autoantígens relacionats amb el desenvolupament de la DM1. GAD65 és una isoforma de l'àcid glutàmic descarboxilasa. Varis estudis donen un paper important a aquest autoantigen en el desenvolupament de la DM1. Així, s'ha observat que cèl·lules CD4⁺ Th1 GAD-reactives aïllades de ratolins NOD indueixen diabetis en ratolins NOD scid (Zekzer,1998). Ratolins NOD transgènics han demostrat que l'expressió o la supressió de la proteïna GAD65 en les cèl·lules β és determinant per al desenvolupament de DM1 (Yoon, 1999). IA-2 (també coneguda com ICA512) és un membre de la família de les proteïnes transmembrana amb activitat tirosina fosfatasa. Aquesta proteïna es localitza en les vesícules secretores de les cèl·lules β i estaria implicada en la secreció d'insulina (Notkins, 2002). Entre els diferents autoantígens coneguts, la insulina és l'única proteïna específica de la cèl·lula β . Estudis realitzats en ratolins NOD donen un paper important a la insulina en el desenvolupament de la diabetis. Igualment, s'ha identificat un clon de cèl·lula T CD8⁺ específic contra la cadena β de la insulina, el qual causa diabetis en ratolins NOD neonatals (Wong, 1999).

4.3.2. Tipus cel·lulars implicats en el desenvolupament de la diabetis de tipus 1.

Varis tipus cel·lulars del sistema immunitari han estat implicats en l'inici i la progressió de la insulinitis entre els quals, els macròfags, els limfòcits B i T, les cèl·lules dendrítiques i les cèl·lules NK-T jugarien un paper important. Aquests poden actuar com a cèl·lules presentadores d'antígens (APC), com a cèl·lules efectores o bé com a reguladors de la resposta immunitària.

Els macròfags tenen un paper important com a APC's i com a cèl·lules efectores en la destrucció de la cèl·lula β . La infiltració d'aquestes cèl·lules precedeix la infiltració de la resta de cèl·lules del sistema immunitari (limfòcits T, cèl·lules NK i limfòcits B). S'ha observat que la inactivació dels macròfags amb sílica resulta una quasi completa prevenció de la insulinitis i la diabetis (Yoon, 2001). Varis estudis demostren que els macròfags tenen un paper essencial en el desenvolupament i en l'activació de les cèl·lules T citotòxiques que destrueixen les cèl·lules β pancreàtiques. Els illots trasplantats en ratolins NOD defectius en macròfags no són destruïts per les cèl·lules T. Això indica que, en un ambient defectiu de macròfags, els limfòcits T perden la seva capacitat per diferenciar-se en cèl·lules T citotòxiques que poden destruir cèl·lules β .

No obstant, quan aquestes cèl·lules T són transferides a ratolins NOD normals, recuperen el seu potencial citotòxic i indueixen el desenvolupament de diabetis (Jun, 1999). Tanmateix, els macròfags també tindrien un paper important com a cèl·lules efectores en la destrucció de les cèl·lules β mitjançant la secreció de citoquines com la IL-1 β , TNF- α i INF- γ , o bé mitjançant la producció de radicals lliures (Yoon, 2001).

Les cèl·lules dendrítiques són un altre dels tipus cel·lulars amb un paper important com a APC's. Aquestes estan entre les primeres cèl·lules presents en el procés inflamatori pancreàtic en ratolins NOD i són abundants en la insulinitis humana (Kukreja, 1999).

S'ha descrit que els limfòcits B tindrien una doble funció en la patogènesi de la DM1. Aquests poden actuar bé com a cèl·lules presentadores d'antígens a limfòcits T, i com a cèl·lules efectores mitjançant l'expressió d'autoanticossos contra els autoantígens, els quals induirien una resposta citotòxica mitjançada per anticòs. S'ha observat que la eliminació de limfòcits B mitjançant el tractament amb anticossos anti- μ elimina completament el desenvolupament de la insulinitis (Noorchashm, 1997).

Varies observacions han donat un paper principal als limfòcits T en el desenvolupament de la DM1. Així, les anàlisi immunohistològiques mostren que la majoria de cèl·lules leucocitàries en els illots són cèl·lules T, que la malaltia no es desenvolupa en ratolins NOD timectomitzats o atímics i que la diabetis pot ser transferida mitjançant la injecció de limfòcits T de ratolins diabètics en ratolins sans (Mathis, 2001). Existeixen dos subtipus de cèl·lules T: cèl·lules T CD8⁺citotòxiques (Tc) i cèl·lules T CD4⁺ helper (Th), les darreres de les quals tenen un paper principal com a cèl·lules efectores. Similarment, les cèl·lules Th es poden diferenciar en Th1 o Th2, en funció del tipus de citoquines que expressen i el tipus de resposta immune que indueixen. Les cèl·lules Th1 estan relacionades amb una resposta immune del tipus cel·lular, com és el cas de la diabetis. Estudis de transferència de clons limfocitaris CD4⁺ o CD8⁺ han demostrat que aquests dos subtipus cel·lulars estan implicats en la patogènesi de la malaltia, essent necessària l'actuació de tots dos per a un desenvolupament òptim (Nagata, 1992). Els limfòcits T CD8⁺ o CD4⁺ responen específicament contra antígens sintetitzats per les cèl·lules β els quals seran presentats mitjançant les proteïnes del MHC de classe I o de classe II, respectivament. Varis

estudis suggereixen que el mecanisme efector de les cèl·lules T serà diferent en funció del subtipus cel·lular. La mort cel·lular provocada pels limfòcits T CD8⁺ es produeix pel reconeixement directe d'un antigen presentat per la pròpia cèl·lula β , mentre que en el cas dels limfòcits T CD4, la mort cel·lular es produirà per un mecanisme indirecte lligat a la proximitat de les cèl·lules β respecte a les cèl·lules T. Les cèl·lules presentadores d'antígens activaran els limfòcits T-CD4⁺, els quals induiran la mort de les cèl·lules β mitjançant la secreció de mediadors solubles (Yoon, 2001).

Les cèl·lules NK-T (Natural Killer-T) també podrien tenir un paper molt important en la regulació de la resposta autoimmunitària. Aquestes es diferencien de la resta de limfòcits derivats del timus en què expressen marcadors cel·lulars característics de les cèl·lules NK (Natural Killer), així com un receptor de cèl·lules T (TCR) quasi-invariable. Després de l'estimulació a través del TCR, les cèl·lules NK-T expressarien grans quantitats de IL-4, induint així la diferenciació i el creixement de cèl·lules Th2 i regulant indirectament la resposta immune mitjançada per cèl·lules Th1. Estudis realitzats en ratolins NOD han mostrat una marcada reducció en el nombre de cèl·lules NK-T així com en la seva capacitat funcional (Chatenoud, 2002).

4.3.3. Mecanismes de destrucció de les cèl·lules β .

L'activació de les cèl·lules efectores, bé pel reconeixement directe d'un autoantigen presentat per la pròpia cèl·lula β , bé, indirectament, a través d'APC's, donarà lloc a l'activació de varis mecanismes que induiran la mort de la cèl·lula β . Aquests mecanismes inclouen factors com la perforina, les citoquines, els radicals lliures i els lligands de mort cel·lular produïts per cèl·lules T (CD4⁺ o CD8⁺), els macròfags o per cèl·lules β (Figura 3) (Thomas, 2000).

La perforina és una glicoproteïna de 534 aa, l'expressió de la qual està principalment confinada a les cèl·lules CD8⁺ i a les cèl·lules NK. La inserció de complexos de perforina tubulars dins la membrana plasmàtica de la cèl·lula β condueix a la lisi cel·lular per osmosi. S'ha descrit que els ratolins NOD deficientes en perforina desenvolupen insulinitis, però que, no obstant, la incidència de diabetis és significativament menor i força més tardana (Kagi, 1997).

Fas és un lligant de mort cel·lular que ha estat relacionat amb el desenvolupament de la DM1. Varis treballs indiquen que Fas tindria un paper principal com a mecanisme efector de la mort de la cèl·lula β . S'ha descrit que ratolins NOD *lpl/lpl* (defectius en Fas) no desenvolupen insulinitis o diabetis, ni de manera espontània ni per transferència adoptiva d'esplenocits de NOD o clons de cèl·lules T (Wong, 1996; Chervonsky, 1997). No obstant, estudis de transferència d'illots de ratolins NOD *lpl/lpl* a ratolins NOD normals donen un paper menor a Fas com a mecanisme efector (Thomas, 2000).

Varis estudis realitzats en ratolins NOD han mostrat una associació entre el desenvolupament de la DM1 i un increment de l'expressió de citocines proinflamatòries (IL-1, TNF- α i INF- α) i citocines Th1 (INF- γ , TNF- β , IL-2 i IL-12). En canvi, l'expressió de citocines Th2 (IL-4, IL-10) ha estat associada a un efecte protector. No obstant això, s'ha observat que tant clons cel·lulars Th1 com Th2 poden transmetre diabetis a ratolins NOD. Això suggereix, que el paradigma Th1/Th2 no és absolut. S'ha descrit que l'efecte citotòxic de les citocines pot ser mitjançat directament sobre les cèl·lules β per la inducció de radicals lliures (cas de INF- γ , IL-1, TNF- α , TNF- β) o perquè les sensibilitza davant la destrucció produïda per les cèl·lules T. S'ha descrit que INF- γ pot induir un increment de la expressió de MHC de classe I, així com IL-1 —i, possiblement, també TNF- α , INF- γ — poden ser els responsables d'un increment de l'expressió de Fas per part de la cèl·lules β (Rabinovich, 1998).

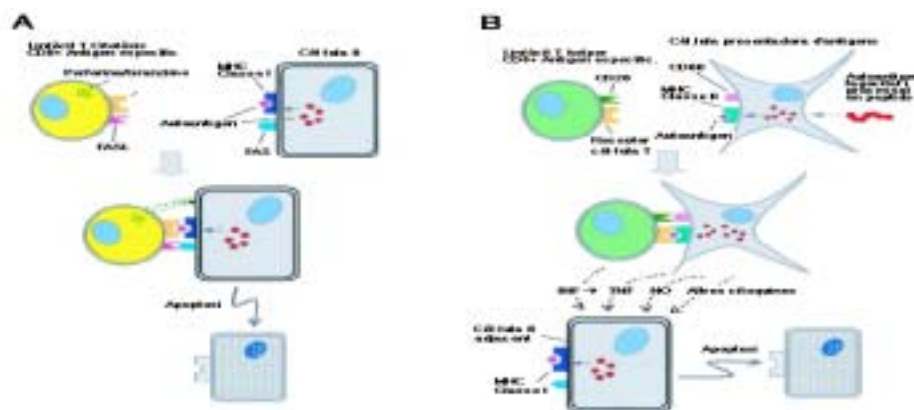


Figura 3. Mecanismes de destrucció de la cèl·lula β : A, Mecanisme de destrucció directe de les cèl·lules β . Autoantgens que són processats i presentats com a pèptids acomplexats amb molècules de MHC de classe I sobre la superfície de les cèl·lules β són reconeguts per limfòcits T CD8+ citotòxics específics d'antigen. La interacció produïda donarà lloc a una sobreexpressió del nombre de molècules co-estimuladores (e.g. FAS/FASL). Una sèrie d'esdeveniments en la via de senyalització produirà la inducció de la mort de la cèl·lula β per apoptosi a través d'un o varis mecanismes efectors (e.g. FAS/FASL, Perforina/Granzime). B, Mecanisme indirecte de destrucció de la cèl·lula β . Autoantgens que són fagocitats, processats i presentats com a

pèptids en un complex amb molècules de MHC de classe II sobre la superfície de APC's (e.g. macròfags i cèl·lules dendrítiques) són reconeguts per limfòcits T CD4+ específics d'antigen. A causa de la interacció es sobreexpressaran molècules co-estimuladores (e.g. CD28/CD80) i es promocionarà l'alliberació d'una varietat de citoquines (e.g. Interferó γ (INF- γ), tumor necrosis factor α (TNF- α)), i NO (òxid nítric) de cèl·lules T CD4+ i APC's, el que produirà l'apoptosi de les cèl·lules β adjacents.

4.4. Models animals per a l'estudi de la diabetis de tipus 1A.

L'aparició dels símptomes clínics en la DM1 té lloc quan més del 80% de la massa de la cèl·lula β ha estat destruïda i la major part dels processos inicials de la malaltia ja s'han produït. Aquest fet dificulta l'estudi de la patologia. Per aquest motiu, s'han obtingut i estudiat varis models animals amb la finalitat de conèixer i dissenyar noves estratègies per al tractament de la malaltia. Actualment, els més utilitzats són models animals de diabetis espontània i de diabetis induïda experimentalment mitjançant la injecció de tòxics específics contra les cèl·lules β .

4.4.1. Models de diabetis espontània: Ratolins NOD (*non-obese diabetic*).

La línia de ratolins NOD deriva d'una sublínia de ratolí Jcl:ICR i va ser establerta al Japó en els laboratoris Shionogi Aburahi el 1980. Aquesta línia presenta un fenotip molt semblant a l'observat en la diabetis autoimmune humana: poldípsia, poliúria, glucosúria severa, hiperglucèmia i deficiència d'insulina (Makino, 1980).

Estudis histopatològics descriuen la presència d'infiltració leucocitària (limfòcits T CD4, CD8, macròfags i cèl·lules NK) en els illots del pàncrees a partir de les 3 setmanes d'edat, un fet també característic en el desenvolupament de la malaltia en humans. Els NOD expressen una única molècula de MHC de classe II, I-A^{g7}, que els fa susceptibles a desenvolupar diabetis. Aquesta és estructuralment i funcionalment homòloga a la molècula de MHC de classe II humana HLA-DQ8, relacionada amb un alt risc de desenvolupar la malaltia. De la mateixa manera, els principals autoantígens en els NOD també són GAD, (pro)insulina i IA-2 (Adorini, 2002).

La remissió espontània s'observa rarament i els animals moren entre 1 o 2 mesos després de l'inici de la malaltia, a no ser que se'ls tracti amb teràpia substitutòria d'insulina. L'edat d'inici i la penetrància de la malaltia és diferent en funció del sexe.

Les femelles desenvolupen la malaltia a les 10 setmanes d'edat, mentre que els mascles ho fan a les 20 setmanes. La incidència acumulativa de la malaltia en condicions d'estabulació lliures de patògens (SPF) a les 30 setmanes de edat és del 70-80% en les femelles, mentre que en els mascles és, aproximadament, del 20% (Kikutani, 1992).

S'ha descrit que existeixen teràpies efectives en la prevenció i el tractament de la diabetis autoimmune, les quals han tingut èxit en aquest model animal però que, no obstant, han fallat quan s'han provat en humans. Això indica, que no és fàcil extrapolar els resultats dels models animals als humans. Aquest fet s'ha associat a l'elevada consanguinitat que presenten els ratolins NOD, mentre que la població humana és molt heterogènia (Adorini, 2002).

Tot i que la incidència de la malaltia es veu afectada per factors ambientals i respon a immunomanipulacions, aquests no són una limitació en l'ús dels ratolins NOD per a l'estudi de la patogènesi de la diabetis autoimmune. Per altra banda, una gran quantitat d'informació sobre la patogènesi de la DM1 s'ha obtingut mitjançant la manipulació genètica de ratolins NOD. L'expressió de diferents transgens —específicament, en les cèl·lules β pancreàtiques sota el control del promotor del gen de la insulina de rata (RIP)— hi han contribuït substancialment (Kay, 2000).

4.4.2. Models de diabetis experimental: Tractament amb estreptozotocina (Stz).

La Streptozotocina (Stz) [2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosurea) 1-D-glucopyranosa] és un antibiòtic d'ampli espectre produït per *Streptomyces achromogenes*. El seu efecte diabetogènic va ser detectat pels Laboratoris Upjohn quan testaven potencials antibiòtics contra aquest microorganisme.

La Stz danya les cèl·lules β d'una manera selectiva, ja que entra a l'interior cel·lular a través del transportador GLUT2. S'ha proposat que, un cop dins, la Stz pot realitzar el seu efecte tòxic mitjançant diferents mecanismes: (1) metilació de DNA, (2) generació de radicals lliures i (3) producció d'òxid nítric. La generació d'ions carboni (CH_3^+) a partir de la descomposició del radical nitrós de la molècula de Stz produirà el trencament del DNA per l'alquilació de bases. La fragmentació del DNA induirà la reparació del mateix mitjançant l'activació de l'enzim poli(ADP-ribosa) sintetasa.

L'activació d'aquest enzim disminuirà el contingut de NAD⁺ intracel·lular i produirà una disminució en la producció d'energia dependent de NAD⁺ i el metabolisme proteic, el que provocarà, finalment, la mort cel·lular. S'ha observat que inhibidors de la poli(ADP-ribosa) sintetasa protegeixen la cel·lula β de la depleció de NAD⁺ i de la mort cel·lular produïda per la Stz (Wilson, 1984).

L'estrès oxidatiu produït per la formació de radicals lliures té un efecte important en la toxicitat de la Stz. S'ha observat que el tractament amb el tòxic incrementa la producció de peròxid d'hidrogen, mentre que l'administració intravenosa prèvia de superòxid dismutasa confereix una protecció enfront la toxicitat produïda per la Stz (Robbins, 1980). Actualment, existeix certa controvèrsia respecte al paper del NO com a mitjancer de la toxicitat de la Stz. Estudis *in vitro* han mostrat que el NO té un efecte tòxic i que aquest pot ser produït per les pròpies cèl·lules (Turk, 1993; Kwon, 1994). No obstant, resultats més recents posen en dubte que *in vivo* hi hagi una producció de NO per part de la pròpia cèl·lula β que indueixi la mort cel·lular (Papaccio, 2000).

El protocol d'administració de la Stz en ratolins té també un paper important en el mecanisme d'inducció de diabetis. Si s'administra intraperitonealment una única dosi de Stz a una elevada concentració (>160 mg/kg de pes viu), el tòxic destrueix ràpidament les cèl·lules β dels illots per una acció citotòxica directa, el que produeix la pèrdua de més del 90% de la insulina pancreàtica i l'aparició d'hiperglucèmia. Alternativament, es poden realitzar múltiples administracions de dosis baixes de Stz (40-50 mg/kg de pes viu). En aquest cas, es redueix l'acció citotòxica de la Stz però s'indueix una resposta inflamatòria contra les cèl·lules β . La infiltració limfocitària (insulitis) destrueix les cèl·lules β dels illots i causa una severa diabetis. Aquest mètode d'administració és l'anomenat "multiple low dose streptozotocin" (MLDStz).

L'edat, el sexe i la soca de ratolí juguen un paper important en la susceptibilitat de desenvolupar insulitis i hiperglucèmia mitjançant el mètode de MLDStz. S'ha observat que, amb una dosi de 40 mg/kg de pes viu, les soques de ratolí CD1 i C57Bl/KsJ presenten una major predisposició a desenvolupar insulitis i hiperglucèmia, mentre que les soques de ratolins BALB/c, C57Bl6/SJL, DBA/2J i C3H/He són resistents a aquesta dosi. Tanmateix, aquestes soques més resistents desenvolupen una clara hiperglucèmia al incrementar la dosi de Stz fins a 50 mg/Kg de pes viu, sense

presentar diferències significatives en el grau d'insulitis (Rossini, 1977). Resultats recents relacionen la reducció o sobreexpressió de IL-4 i IL-10 (citoquines del tipus Th-2) amb la susceptibilitat o resistència a desenvolupar un major o menor grau d'insulitis en el model MLDStz (Muller, 2002).

5. TRACTAMENT DE LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 1.

Actualment, s'han desenvolupat dues aproximacions terapèutiques per la malaltia: (1) la teràpia substitutòria amb insulina i (2) el trasplantament de pàncrees o illots.

5.1. Teràpia substitutòria amb insulina.

La teràpia substitutòria més convencional consisteix en l'administració subcutània d'insulina exògena. L'objectiu d'aquesta teràpia és mantenir la normoglicèmia. Per aconseguir-ho es requereix que el perfil insulinèmic del pacient diabètic sigui igual al que tindria un individu normal, és a dir, uns nivells basals d'insulina superposats amb uns pics d'insulina postpandrials.

Per tal de mimetitzar els perfils d'insulinèmia normals, la insulina exògena s'administra en forma de dues preparacions; les preparacions d'acció ràpida i les d'acció lenta. Les preparacions d'insulina d'acció ràpida, el que s'anomena *regular insulin*, estan constituïdes per molècules d'insulina en solució, les quals són ràpidament absorbides. Aquest tipus de preparacions són utilitzades per cobrir els requeriments pandrials d'insulina i presenten el seu inici d'acció als 20-30 minuts, un pic a les 1-2h i una duració de 6-8 hores després de la seva administració subcutània. La tendència de la insulina a associar-se en forma d'hexamers 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, 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 GB, 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 (*NPH*) o zenc (*lente insulin*), 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, amb un inici d'acció a les 1-2 hores, un pic a les 4-8 hores i una duració de fins a 12-18 hores post injecció (Pickup,1997). Les preparacions de llarga duració d'insulina tenen tres defectes farmacocinètics i farmacodinàmics importants: (1) el pic d'alliberació d'insulina, 4-5 hores post injecció subcutània, coincideix amb l'interval de temps en què menys requeriments d'insulina són necessaris, el que incrementa el risc d'hipoglucèmia, (2) a les 5-6 hores després del pic d'acció hi ha una eliminació ràpida de la insulina que coincideix amb el període en què es produeix el fenomen del *dawn* (moment de menor sensibilitat a la insulina), moment en què es requereix una major quantitat d'insulina per evitar la aparició d'una hiperglucèmia en dejú, i (3), la variabilitat existent en l'absorció de la insulina després de la injecció subcutània. Actualment, s'han desenvolupat diversos anàlegs d'insulina per a les preparacions de llarga duració amb la finalitat d'oferir un millor perfil insulinèmic.

Normalment, s'administren preparacions combinades d'insulina ràpida i lenta, les quals es presenten en unes proporcions predeterminades. No obstant, tot i intentar mimetitzar el perfil endogen d'insulina, encara estan allunyats del que seria el perfil fisiològic d'un individu normal, alhora que produeixen en molts casos l'aparició d'estadis d'hiperglucèmia i hipoglucèmia.

La insulina pot ser injectada subcutàniament de manera rutinària en braços, cames, abdomen i natges. La rotació del lloc de injecció és important amb la finalitat d'evitar l'aparició de lipohipertròfia i lipoatròfia (American Diabetes Association, 2001).

Els pacients diabètics poden utilitzar diversos règims d'administració d'insulina per obtenir uns nivells d'insulina en sang que permetin mantenir un bon control de la glucèmia. Entre els diferents règims establerts, la teràpia intensiva amb insulina s'ha

descriu com el règim més adequat per assolir una glucèmia més pròxima a la normalitat. Aquesta està centrada en aconseguir la normoglicèmia mitjançant 3 o més injeccions diàries d'insulina, o mitjançant l'implant d'una bomba d'insulina. S'ha descrit que aquest tipus de teràpia permet aconseguir un bon control de la glucèmia, així com una reducció entre el 35% i el 70% de la progressió i el desenvolupament de les complicacions clíniques més severes associades a la diabetis. No obstant, aquest tipus de tractament no és aplicable a la majoria de pacients, com nens o ancians, ja que requereix un control exhaustiu. A més a més, duu associat un elevat risc d'aparició d'episodis hipoglucèmics (DCCT, 1993).

5.2. Trasplantament de pàncrees i illots.

Els trasplantaments de pàncrees i illots pretenen proporcionar una font endògena controlada d'insulina i altres hormones de les cèl·lules dels illots.

5.2.1. Trasplantament de pàncrees.

El trasplantament de pàncrees és l'únic dels tractaments existents que és capaç de restaurar el metabolisme normal durant llargs períodes de temps. Aquest està associat a una normalització de l'homeostasi de la glucosa i a un estat d'independència a la insulina que milloren la qualitat de vida del pacient. No obstant aquests beneficis van acompanyats d'importants riscos: (1) el procediment quirúrgic encara és molt complicat tècnicament i està associat a un elevat índex de mortaldat i (2) es requereix d'un tractament d'immunosupressió crònica el qual comporta un elevat risc de patir infeccions i desenvolupar tumors. De la mateixa manera, estudis realitzats sobre els avantatges del trasplantament de pàncrees respecte al desenvolupament de les complicacions secundàries han demostrat que, tot i els beneficis obtinguts, aquest únicament té un efecte estabilitzador de les complicacions secundàries si tenim en compte que aquestes ja estan molt avançades quan es realitza el trasplantament (Landgraf, 1996). Per aquest motiu, el trasplantament de pàncrees és una opció que normalment es duu a terme tard, quan apareixen complicacions renals importants i es requereix un trasplantament de ronyó (Pipeleers, 2002).

5.2.2 Trasplantament d'illots.

El trasplantament d'illots ha esdevingut actualment una de les alternatives més segures al trasplantament de pàncrees. Estudis en models animals han mostrat que mitjançant l'ús de tècniques quirúrgiques més senzilles, aquests es poden implantar en varis llocs de l'organisme (melsa, fetge, càpsules suprarenals, etc.), la qual cosa permet obtenir un millor alliberament d'insulina a nivell perifèric. Durant els últims anys diversos pacients diabètics han estat sotmesos a aquest trasplantament. No obstant, un baix nombre de pacients han desenvolupat insulino independència durant llargs períodes de temps. Tot i així, aquest tractament suposa una recuperació de la producció endògena d'insulina; el que comporta una millor homeostasi de la glucosa amb un menor nombre d'episodis d'hipoglucèmia, una normalització de la hemoglobina glicosilada, així com, un potencial retard en les complicacions secundàries associades (Pippelers,2002; Oberholzer, 2001). Recentment, el grup d'Edmonton ha realitzat el trasplantament d'illots a varis pacients diabètics de tipus 1 amb un nou règim immunosupressor lliure de glucocorticoids, cosa que ha permès obtenir un elevat percentatge d'èxit (assoliment d'insulino independència) (Shapiro,2000).

La manca de donants d'illots apropiats, el requeriment 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 en el tractament de la DM1.

Un dels problemes que agreugen la manca de donants d'illots és l'absència d'un mètode òptim per a la seva purificació. En els estudis d'Edmonton es van requerir de 2 a 4 pàncrees en cada trasplantament, ja que el nombre d'illots necessari per assolir la insulino independència era d'un mínim de 9000 illots trasplantats per pacient. Aquest nombre representa el 50% d'illots que trobem en un pàncrees (Shapiro, 2000). Per aquest motiu, actualment s'està investigant el desenvolupament d'un procediment òptim de purificació d'illots i la seva manipulació genètica per evitar el rebuig. També s'està investigant l'obtenció d'una font alternativa de cèl·lules productores d'insulina, així com la generació d'una línia de cèl·lula β i la diferenciació de cèl·lules mare embrionàries o adultes cap a cèl·lules β (Soria, 2000; Ramiya, 2000).

La vulnerabilitat dels illots trasplantats a un atac autoimmunitari és una de les majors barreres per a l'aplicació clínica del trasplantament d'illots. Per aquest motiu es requereix d'un règim immunosupressor general. Inicialment, en el trasplantament d'illots s'utilitzaven inhibidors de la calcineurina (ciclosporina i tacrolimus) i esteroids. No obstant, aquestes drogues tenen efectes diabetogènics a causa de la seva toxicitat sobre la cèl·lula β i de la seva inducció de resistència a la insulina. S'ha proposat la inducció de tolerància immunitària o l'immunoaïllament (macrocapsules o microcapsules) com a mètodes alternatius a desenvolupar a fi de protegir els illots trasplantats del atac autoimmunitari, i eliminar la necessitat d'un règim immunosupressor general (Oberholzer, 2001).

6. TERÀPIA GÈNICA.

6.1. Introducció a la teràpia gènica.

La teràpia gènica és una estratègia clínica basada en la modificació del genoma cel·lular mitjançant la introducció de material genètic forà (DNA o RNA) per tal de corregir o alleugerir els símptomes d'una malaltia (Mulligan,1993; Crystal,1995).

Existeixen dues categories de teràpia gènica en funció de l'estratègia que se segueixi en l'alliberació 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 els vectors recombinants. Aquest tipus d'estratègia implica un major coneixement de la farmacocinètica clàssica respecte a la biodisponibilitat del vector, al destí i a la distribució dels components del vector, així com a les relacions dosi-resposta (Anderson,1998).

Un cop transferit el material genètic, el producte del nou gen pot actuar sobre la pròpia cèl·lula modificada, sobre les cèl·lules veïnes o bé entrar en circulació sanguínia per

actuar sobre cèl·lules distants (Blau, 1995). El material genètic pot ser introduït per afegir nous gens o per augmentar la dosi gènica (Dellorusso, 2002), per reemplaçar gens alterats, o bé per silenciar l'expressió de certs gens (Aoki, 2003).

El principal problema de la teràpia gènica resideix, fonamentalment, en el desenvolupament d'un sistema de transferència (o vector) que ens permeti alliberar el material genètic a l'interior cel·lular de manera segura, eficient i específica.

Els vectors de teràpia gènica han de superar una sèrie d'obstacles abans que el gen d'interès tingui l'efecte desitjat. Inicialment, el vector ha d'arribar a la superfície de la cèl·lula desitjada. Després de contactar amb la cèl·lula, els vectors han d'unir-se i entrar al seu interior; generalment aquest és un procés mitjançat per un receptor específic el qual pot limitar l'entrada a l'interior cel·lular. Un cop dins la cèl·lula, el material genètic ha de ser alliberat i evitar la seva degradació pels lisosomes. Finalment, el material genètic ha de translocar-se al nucli prèviament a què es pugui produir l'expressió dels gens. En el cas dels vectors retrovírics, aquest últim procés implica un pas addicional previ en el citoplasma que implica la transcripció reversa del RNA del vector a DNA (Afione, 1995).

Actualment no s'ha descrit cap vector de teràpia gènica 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 d'elegir el tipus de vector que es vol fer servir. Per a la seva utilització, els vectors de teràpia gènica han de poder ser produïts fàcilment al laboratori en grans quantitats i en elevades concentracions, han de tenir la capacitat de contenir gens amb les seves seqüències reguladores, alhora que han de ser estables dins de la cèl·lula hoste de manera que no es dilueixi en dividir-se aquesta. Tanmateix, propietats intrínseques del vector com la seva immunogenicitat, el seu tropisme cel·lular o la capacitat de transferir cèl·lules quiescents o en divisió, són importants en el moment d'elegir entre diferents tipus de vectors pel tractament d'una mateixa malaltia (Bosch, 2002).

Els vectors recombinants que actualment s'utilitzen en protocols de teràpia gènica els podem classificar com a vectors virals o no-virals, en funció que aquests utilitzin o no els virus com a sistema de transferència de gens.

6.1.1. Vectors virals.

El cos humà ha desenvolupat varis sistemes de defensa per tal de protegir-se contra els perills ambientals; per exemple la incorporació de DNA exogen. No obstant, els virus han desenvolupat múltiples mecanismes per a superar aquestes barreres i ser capaços d'incorporar el seu material genètic dins les cèl·lules humanes. Per aquest motiu, des dels inicis de la teràpia gènica, molts dels esforços s'han centrat en la utilització dels virus com a vectors de teràpia gènica per incorporar gens terapèutics a pacients.

En el cas dels vectors virals, aquests han estat modificats per tal que, en infectar la cèl·lula diana, tinguin una transducció abortiva. En aquest cas, la càpside vírica d'aquests vectors conté un genoma víric que ha estat manipulat genèticament, de manera que només mantenen la capacitat d'infectar la cèl·lula i introduir el material genètic però sense poder replicar-se per produir nous virus recombinants (Kay, 2001).

Durant els últims anys, diversos tipus de virus existents a la natura s'han modificat per tal de poder-los utilitzar com a vectors de teràpia gènica. La taula 1 resumeix algunes de les seves propietats més característiques.

Taula 1. Vectors virals per a la teràpia gènica.

Vectors	Avantatges	Desavantatges
Adenovirus	Elevada eficiència. Gran capacitat de DNA. (36 Kb) Pot infectar cèl·lules quiescents i en divisió. Elevada producció de virus i expressió del transgen.	Expressió transitòria. Provoca resposta immunològica. Tropisme promiscu, infecció no controlada.
Virus adenoassociats (AAV)	Estabilitat elevada. Pot infectar cèl·lules quiescents i en divisió. Probablement no patogènic i de baixa immunogenicitat.	Poca capacitat pel DNA exogen (4.8 Kb). Difícil de produir. Limitada efectivitat a causa dels anticossos preexistents contra AAV.
Retrovirus (MMLV)	Expressió estable.	Únicament infecta cèl·lules en

		divisió. Integració aleatòria en el genoma de l'hoste. Limitada capacitat de DNA (8Kb)
Lentivirus	Pot infectar cèl·lules quiescents i en divisió. Expressió estable durant llargs períodes de temps.	Calen més estudis per garantir la no patogenicitat. S'integra dins el genoma hoste
Herpes virus	Pot infectar cèl·lules quiescents i en divisió. Gran capacitat de DNA (50 Kb).	Neurotoxicitat mal caracteritzada Expressió transitòria

6.1.2. Vectors no virals.

Els vectors no virals presenten com a principal avantatge la seva seguretat. No obstant, tenen l'inconvenient de no ser tant eficients com els vectors virals a l'hora de transferir gens. Tanmateix, la seva fàcil manipulació, el baix cost que suposa la seva producció i l'alta flexibilitat en la mida del transgèn que és alliberat, han fet dels vectors no-virals un dels sistemes de transferència gènica més atractius per a la seva utilització en teràpia gènica.

Entre les diferents aproximacions existents, la injecció directa de DNA plasmídic en solució és la més senzilla i segura. Wolff i col·laboradors varen observar que les cèl·lules musculars podien captar i expressar un determinat gen quan el seu DNA codificant era injectat en el múscul esquelètic (Wolff, 1990). La injecció de DNA plasmídic en solució pot ser administrada directament sobre un teixit concret, o bé sistèmicament via intravenosa. Durant els últims anys, múltiples teixits com el múscul esquelètic, el fetge o la pell han estat transferits mitjançant la injecció de DNA en solució. Les majors limitacions d'aquesta aproximació són la baixa eficiència en la transferència del DNA i la baixa expressió del transgèn, ja que l'expressió queda localitzada en la zona on ha estat injectat el DNA un cop administrat directament sobre el teixit, així com la seva ràpida eliminació quan s'administra sistèmicament. Per aquest motiu, s'han desenvolupat diverses manipulacions físiques i químiques que han permès augmentar l'eficiència de transferència de DNA a la cèl·lula diana com la

utilització d'ultrasons, la injecció hidrodinàmica, el gene-gun, l'electrotransferència de DNA en solució, els lípids catiónics o polímers catiónics, etc.

L'electrotransferència ha estat àmpliament utilitzada per introduir gens *in vitro*. Aquesta consisteix en l'aplicació d'un camp elèctric a les cèl·lules per tal de promocionar el trànsit de molècules de DNA cap a l'interior cel·lular. Sota la influència d'un camp elèctric, la distribució dels ions adjacents a la membrana plasmàtica és modificada, el resultat és una sèrie d'alteracions de la membrana que predisposen la formació de porus (Figura 4). Un cop establerts els porus, les molècules carregades i els ions poden travessar la membrana i entrar dins la cèl·lula per un procés de difusió passiva, o bé per un procés electroforètic o electrosmòtic per acció del camp elèctric. (Neumann, 1999).

L'eficiència de l'electrotransferència ve determinada pel grau de permeabilització de la membrana. Els paràmetres principals que governen l'eficiència de l'electrotransferència inclouen la mida cel·lular, la intensitat i la duració del camp elèctric i la freqüència i el nombre de polsos aplicats. La força del camp elèctric determina quina és l'àrea de membrana permeabilitzada, mentre que la duració del camp i el nombre de polsos afecten la persistència dels porus en la membrana. Aquests paràmetres han de ser optimitzats per a cada teixit per tal de minimitzar el dany cel·lular produït per l'alteració del contingut cel·lular (Gehl, 1999; Somiari, 2000). Un altre factor determinant en l'eficiència de l'electrotransferència és la composició de la solució de DNA injectada. Aquesta influenciarà el transport electrosmòtic, així com la capacitat de formació dels porus a la membrana. Les solucions normalment utilitzades són el PBS o la solució salina, ja que ambdues són isotòniques, estables, i no tòxiques. A més, s'ha descrit que la disminució de la concentració salina del DNA en solució a injectar permet obtenir un increment tres vegades superior en l'eficiència d'electrotransferència respecte a les condicions salines normalment utilitzades (≈ 150 mM) (Lee, 2002).

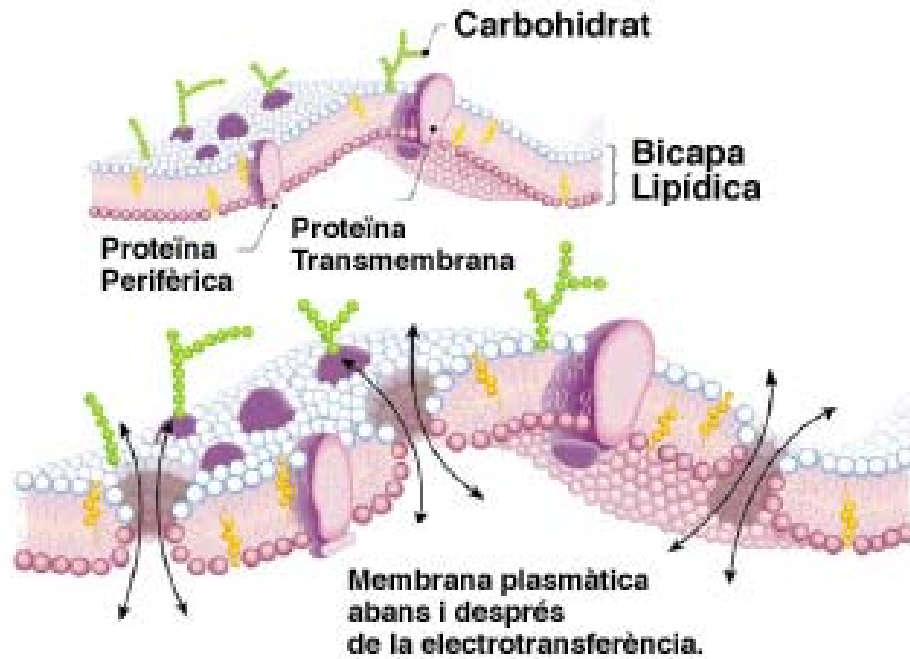


Figura 4. Efecte de l'electrotransferència sobre la membrana plasmàtica. L'aplicació d'un camp elèctric a la cèl·lula genera la producció de porus transitoris a la membrana plasmàtica, els quals permeten el pas d'ions i molècules de DNA cap a l'interior cel·lular.

Encara que mínim, la reducció del dany cel·lular és actualment un dels objectius principals en l'aplicació clínica de l'electrotransferència. El dany tissular està directament associat al grau de permeabilitat cel·lular produït, el qual, al seu torn, ve determinat per les característiques del camp elèctric administrat. Per aquest motiu, s'estan estudiant diverses aproximacions; la generació de nous electrodes (Liu, 2002b), el pretractament amb enzims com la hialuronidasa (McMahon, 2001), o bé la co-injecció de poloxamers surfactants com el 188, que permeten reduir la intensitat del camp elèctric, així com facilitar la recuperació tissular. Aquesta tècnica ha estat molt utilitzada per a la transferència de gens a múscul esquelètic (Maruyama, 2000), a fetge (Heller, 2000), a testicles (Yamazaki, 2000), a pell (Johnson, 1998), a còrnia (Sakamoto, 1998), a cor (Harrison, 1998) i a tumor mamari (Lohr, 2001). La majoria de protocols d'electrotransferència utilitzen la injecció local del DNA plasmídic. No obstant això, s'ha descrit que la transferència de gens al fetge és més efectiva quan es realitza l'electrotransferència després de l'administració sistèmica del DNA a través de la vena cabdal. (Liu, 2002a).

6.2. Teràpia gènica per a la diabetis mellitus de tipus 1.

El tractament actual de la diabetis de tipus 1 se centra en corregir la manca d'insulina amb l'administració subcutània d'insulina recombinant, o bé amb el trasplantament de pàncreas o illots. No obstant, aquests tractaments són imperfectes. La teràpia substitutòria d'insulina no ofereix uns perfils fisiològics de secreció d'insulina normals, no prevé el desenvolupament de complicacions secundàries a llarg termini, i la reducció de la hiperglucèmia a normoglucèmia està associada a un elevat risc d'hipoglucèmia. Per altra banda, la font limitada d'òrgans i illots per trasplantar, així com el requeriment d'un règim d'immunosupressió crònica, no compensen els beneficis obtinguts amb el trasplantament. Per aquest motiu, s'han desenvolupat diverses aproximacions de teràpia gènica centrades en proporcionar un millor control de la glucèmia, les quals puguin suplir i/o millorar els tractaments actuals. En aquest sentit, la modificació genètica de cèl·lules extrapancreàtiques per què produeixin insulina, o bé, per què incrementin la captació i la utilització de glucosa són dues de les estratègies desenvolupades a fi d'assolir una millor homeostasi de la glucosa.

6.2.1. Producció d'insulina per cèl·lules extrapancreàtiques.

La producció d'insulina per part de cèl·lules extrapancreàtiques ha estat una de les aproximacions més utilitzades per suplir la manca d'insulina característica de la DM1. En aquest sentit, en el nostre laboratori vàrem demostrar que era possible produir insulina de manera regulada a fetge (Valera, 1994b). La insulina pot ser produïda directament per la transferència del seu propi gen (Muzzin, 1997; Gros, 1999; Abai, 1999; Riu, 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, 2000; Kojima 2003).

Aquesta aproximació té l'avantatge que les cèl·lules extrapancreàtiques productores d'insulina no estan subjectes a l'atac autoimmunitari característic de la malaltia (Lipes, 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 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 (Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg), els quals poden ser produïts a les unions 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, 1994). Una avantatge d'aquesta aproximació és que el processament de la insulina produeix pèptid-C, el qual és secretat conjuntament amb l'hormona. Varis 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, 1997; Wahren,2000). Alternativament, es pot variar la composició del pèptid-C substituint-lo per un pèptid que proporcioni l'estructura tridimensional de la insulina, de manera que no sigui necessària la seva proteòlisi. S'ha descrit que la substitució del pèptid-C per l'heptapèptid (Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg) permet obtenir una insulina recombinant amb una activitat biològica substancialment superior a l'observada en la proinsulina humana i lleugerament inferior a la de la insulina (Lee, 2000).

Durant els últims anys, varis tipus de cèl·lules somàtiques han estat modificades 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 nivells fisiològics, el que podria reemplaçar completament la teràpia substitutòria actual.

Diverses aproximacions han estat utilitzades a fi d'assolir una producció regulada d'insulina. La més senzilla consisteix en la transferència del gen de la proinsulina en una cèl·lula diana que tingui les mateixes característiques que les cèl·lules β , com les cèl·lules K o les cèl·lules neuroendocrines (Cheung, 2000; Hughes,1993; Stewart, 1994). No obstant, la necessitat de desenvolupar mètodes més efectius de transferència gènica a les cèl·lules K i l'increment de la producció de l'hormona adrenocorticotropa (ACTH) per part de les cèl·lules neuroendocrines dificulten la seva utilització. Una alternativa a aquesta aproximació ha estat la utilització de promotors hepàtics regulables per glucosa i/o insulina. En aquest sentit, promotors com el de la piruvat quinasa hepàtica (LPK) o el de la proteïna Spot 14 (S14) han estat utilitzats per tal d'obtenir una expressió i una producció d'insulina en resposta als nivells de glucosa en sang (Thulé, 2000; Lee, 2000). No obstant, aquesta aproximació no evita el risc d'aparició

d'hipoglucèmia, el que fa necessari la utilització de promotors gènics que a la vegada siguin regulats pels nivells d'insulina circulants. S'ha descrit que la transcripció del gen de la fosfoenol piruvat carboxiquinasa (PEPCK) és sensible als nivells de glucagó i d'insulina; activant-la i inhibint-la, respectivament. Estudis *in vivo* realitzats en el nostre laboratori en ratolins transgènics que expressaven el gen de la insulina sota el control del promotor de la PEPCK, han demostrat que la insulina pot ser produïda i regulada fisiològicament per teixits extrapancreàtics. De la mateixa manera, hem observat que en ratolins transgènics diabètics l'expressió d'insulina per part del fetge permetia contrarestar les alteracions diabètiques produïdes a nivell hepàtic, i, a la vegada, reduir parcialment el desenvolupament de la hiperglucèmia (Valera, 1994b). Igualment, estudis *in vitro* en cèl·lules d'hepatoma que expressen el gen de la insulina humana mutada sota el control del promotor de la PEPCK, han mostrat un augment de la secreció d'insulina 15 minuts després de la inducció amb dibutyrl AMP cíclic més dexametasona (Gros, 1997). A més a més, la insulina produïda era biològicament activa ja que aquesta bloquejava l'expressió endògena de la PEPCK, i induïa un increment de la captació i la utilització de glucosa (Gros, 1997). Recentment, s'han descrit nous promotors com el de la glucosa-6-fosfatasa (G-6Pasa), promotors quimèrics que combinen elements reguladors induïbles per glucosa (GIRE) del promotor de la LPK i elements reguladors inhibits per insulina com el del promotor de la *insulin-like growth-factor-binding protein* (IGFBP-1), els quals permeten obtenir una producció d'insulina regulada per la pròpia hormona i els nivells de glucosa circulant (Chen,2000, Thulé, 2000).

No obstant, tot i que aquesta aproximació sembla ser efectiva, no és perfecta. El principal problema resideix en l'interval de temps requerit entre la regulació transcripcional del gen i la producció de la insulina. El temps d'alliberació de la insulina és crucial per a l'òptima regulació de l'homeostasi de la glucosa, ja que un alliberament tardà de la insulina pot conduir a una intolerància de la glucosa i a l'aparició d'episodis hipoglucèmics. S'ha descrit que quan el gen de la insulina és regulat sota el promotor de la LPK, els increments de la insulina modificada en el plasma dels ratolins eren posteriors als increments observats en ratolins normals després d'una descàrrega de glucosa (Lee, 2000). Per tant, és necessari el desenvolupament d'un sistema que, a la vegada, ens permeti regular tant la transcripció com la secreció de l'hormona. En aquest sentit, actualment 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 (Riviera, 2000)

Tot això ha fet que, actualment, s'estiguin desenvolupant noves estratègies per tal d'obtenir un millor perfil insulinèmic que proporcioni una millor homeostasi de la glucosa. Una d'aquestes aproximacions es basa en la manipulació de cèl·lules extrapancreàtiques per què produeixin uns nivells basals d'insulina, els quals poden combinar-se amb un tractament substitutori convencional. En aquest cas, l'administració d'insulina exògena supliria els pics d'insulina post pandrials, mentre que la producció basal d'insulina proporcionaria els nivells d'insulina requerits entre ingestes; això milloraria el control de la glucèmia i evitaria el desenvolupament de les complicacions a llarg termini.

Durant els últims anys, varis teixits extrapancreàtics com el fetge i el múscul esquelètic han estat proposats com a teixits diana per a la producció basal d'insulina (Gros, 1999; Abai, 1999; Riu, 2002, Martinegni, 2002; Dong, 2002). 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 uns nivells basals de l'hormona, i contrarestar-ne així la disminució associada al desenvolupament de diabetis. Per aquest motiu, vàrem 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, 2002). Estudis previs han demostrat que les cèl·lules musculars són capaces de produir insulina funcional (Gros, 1999).

Els estudis realitzats en els ratolins transgènics diabètics han demostrat que la producció d'insulina per part del múscul permet mantenir uns nivells elevats d'insulina en sang i reduir parcialment la hiperglucèmia (Riu, 2002). El múscul esquelètic presenta uns nivells elevats de receptor d'insulina (Lamothe,1998; White,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. L'expressió d'insulina incrementa

l'expressió i la translocació del transportador GLUT4 a la membrana plasmàtica, així com l'activitat i l'expressió de la HKII. Això, permet incrementar l'entrada de glucosa cap a l'interior cel·lular. No obstant, la limitació observada en aquest model és la inhibició de la HK II per part de la glucosa-6-P, fet que evita assolir la completa normalització de la glucèmia (Riu, 2002). A més a més, s'ha observat que la suplementació de la teràpia convencional amb una producció basal d'insulina per part del múscul permet obtenir una millor tolerància a la glucosa, així com un millor metabolisme lipídic (Riu, 2002; Dong, 2002).

6.2.3 Increment de la captació i la utilització de glucosa per les cèl·lules extrapancreàtiques.

Altres estratègies de teràpia gènica per a la DM1 estan centrades en la manipulació genètica de cèl·lules extrapancreàtiques per tal que captin més glucosa mitjançant un increment de la seva fosforilació. S'ha descrit que els principals teixits responsables de l'eliminació de glucosa després d'una ingesta són el fetge i el múscul esquelètic (DeFronzo, 1997). No obstant, en cas de diabetis, l'absència d'insulina provoca que la captació de glucosa d'aquests teixits sigui menor, el que contribueix al desenvolupament d'hiperglucèmia.

A fi de recuperar la capacitat d'eliminació de glucosa dels teixits extrapancreàtics, en el nostre laboratori hem obtingut ratolins transgènics que expressaven l'enzim glucoquinasa al fetge i al múscul esquelètic. La GK és un enzim que regula la fosforilació de la glucosa a glucosa-6-P i que és expressada en el fetge, en les cèl·lules β pancreàtiques i en les cèl·lules neuroendocrines del tracte intestinal i l'hipotàlam (Jetton, 1994; Matschinsky, 1996). A diferència de la resta d'hexoquinases, la GK no és inhibida per la glucosa-6-P 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, 1990; Iynedjian, 1993; Printz, 1993). S'ha descrit que l'expressió de la GK *in vitro* en cèl·lules que són absents de l'expressió de la GK endògena —com cèl·lules d'hepatoma o de múscul—, condueix a incrementar tant la captació i la utilització de glucosa com la síntesi de glucogen, el que suggereix que aquest enzim controla el metabolisme de la glucosa (Valera, 1994a; Baqué, 1998).

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 PEPCK 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 cetogènesis en aquests animals són similars als observats en els ratolins normals (Ferre, 1996a). De la mateixa manera, la transfecció del gen de la GK a hepatòcits mitjançant adenovirus dona lloc a un increment del flux glucolític, així com a un increment dels nivells de síntesi de glicogen i àcids greixosos. Aquest increment en la utilització hepàtica de glucosa s'ha associat a una marcada reducció dels nivells de glucosa en sang i a una millor tolerància a la glucosa. Al mateix temps s'ha observat que la teràpia combinada de baixes dosis d'insulina, juntament amb la expressió de la GK al fetge, proporciona un millor control de la glucèmia en ratolins diabètics que en ratolins tractats únicament amb insulina (Morral, 2002). Tanmateix, tot i que la sobreexpressió hepàtica de la GK permet assolir una normalització de la glucèmia, la seva aplicació en teràpia gènica és limitada a causa de l'acumulació de glicogen i greix en el fetge (Morral, 2002; Ferre, 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 per tal d'incrementar el grau de fosforilació de la glucosa; això n'ha augmentat la captació i ha normalitzat les alteracions diabètiques. En aquest sentit, hem desenvolupat aquesta nova aproximació terapèutica mitjançant la utilització de ratolins transgènics que expressen GK sota el control del promotor del MLC (Otaegui, 2000), així com via el trasplantament de cèl·lules de mioblasts C₂C₁₂ modificades genèticament amb el gen de la GK a ratolins diabètics (Otaegui, 2002).

Els estudis realitzats en els ratolins transgènics mostren que l'expressió de la GK en el múscul esquelètic dona lloc a un increment de les concentracions de glucosa-6-P i de glicogen, 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. A més a més, en diabetis, tot i l'increment de la captació de glucosa per l'expressió de glucoquinasa, aquesta només permet reduir parcialment la hiperglucèmia. L'absència d'insulina dona lloc a una disminució dels nivells de GLUT4 i al transport insulino-depenent, el que redueix el flux d'entrada de

glucosa cap a l'interior de la cèl·lula muscular (Burcelin, 1993; Napoli, 1995 i Kahn, 1992). Igualment, el tractament amb insulina durant la diabetis incrementa els nivells de GLUT4 en el múscul esquelètic, el que produeix una major entrada de glucosa dins la cèl·lula (Kahn, 1992; Burcelin, 1993). 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, 2000).

De forma similar al que vam observar en els ratolins transgènics, l'expressió de GK en les cèl·lules de mioblast C2C12 dóna lloc a un increment del consum de glucosa, de la producció de lactat i de la síntesi de glucogen. A més a més, aquest consum de glucosa és dependent de la concentració de glucosa en el medi de cultiu (Otaegui, 2002). Al mateix temps, estudis realitzats en ratolins diabètics mostren que el trasplantament de miotubs C2C12 GK prèviament a la inducció de diabetis experimental permet contrarestar el desenvolupament d'hiperglucèmia, polidípsia i polifàgia. De la mateixa manera, el trasplantament d'aquests miotubs en ratolins que presenten una oberta diabetis dóna lloc a una disminució de la hiperglucèmia (Otaegui, 2002).

Tots aquest resultats 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.

L'elevada capacitat del múscul esquelètic per captar glucosa, així com per produir proteïnes de manera sistèmica, fan d'aquest teixit una diana per al desenvolupament de noves aproximacions de teràpia gènica en el tractament de la diabetis de tipus 1. Els estudis realitzats en ratolins transgènics MLC/GK diabètics suggereixen que l'increment en la fosforilació de la glucosa, està limitat pel transport del sucre cap a l'interior cel·lular. En canvi, en els ratolins transgènics MLC/hIns, la captació de glucosa està limitada, no pel transport del sucre dins de la cèl·lula, sinó per la inhibició que presenta la HKII pel seu producte la glucosa-6-P. Així doncs, l'objectiu d'aquest treball ha estat estudiar si la producció d'insulina, juntament amb un increment de la captació de glucosa per part del múscul mitjançant l'expressió de GK, podia ser suficient per disminuir la hiperglicèmia diabètica i superar així les limitacions observades de manera individual en les dues aproximacions anteriors.

Aquest objectiu general es va dividir en els següents objectius concrets:

1. Estudi de la coexpressió de la insulina i de la glucoquinasa en el múscul esquelètic d'animals transgènics en la contrarestar de la hiperglicèmia diabètica.

1.1. Obtenir un animal doble transgènic que expressi alhora insulina humana madura i glucoquinasa en el múscul esquelètic.

1.2. Estudiar si la producció constitutiva d'insulina humana madura, juntament amb l'increment de la captació de glucosa, mitjançant l'expressió de glucoquinasa, en cèl·lules musculars pot contrarestar les alteracions metabòliques que resulten de la inducció de diabetis experimental.

2. Desenvolupar una nova aproximació de teràpia gènica no-viral per la diabetis mellitus de tipus 1.

2.1. Determinar la capacitat de transferir gens a múscul esquelètic amb la tècnica d'electrotransferència de DNA plasmídic en solució en animals sans i diabètics.

2.2. Estudiar *in vivo* la capacitat del múscul esquelètic de reduir la hiperglucèmia diabètica mitjançant l'electrotransferència conjunta dels gens de la insulina i de la glucoquinasa en animals diabètics.

1.1. OBTENCIÓ DE RATOLINS DOBLE TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN ELS GENS QUIMÈRICS MLC/hIns i MLC/GK.

En la primera part d'aquest treball vam estudiar si la manipulació genètica del múscul esquelètic per tal que produís insulina i incrementés la captació de glucosa mitjançant l'expressió de l'enzim glucoquinasa, podia corregir el desenvolupament de l'estat diabètic i esdevenir així una nova teràpia per al tractament de la malaltia. Amb aquest objectiu, es van obtenir ratolins doble transgènics que expressaven específicament a múscul esquelètic els gens de la insulina i de la glucoquinasa.

1.1.1. Obtenció dels ratolins doble transgènics MLC/hIns+GK.

L'obtenció dels ratolins doble transgènics es va realitzar a partir de l'encreuament de dues línies de ratolins transgènics que expressaven constitutivament a múscul esquelètic els gens de la glucoquinasa (Otaegui, 2000), o bé el de la insulina humana (Riu, 2002) sota el control del promotor de la cadena lleugera de la miosina (MLC). Com a resultat dels encreuaments es van obtenir quatre grups de ratolins: ratolins control, ratolins únicament transgènics pel gen de la insulina humana (Tg Ins) o pel de la glucoquinasa (Tg GK) i ratolins doble transgènics (Tg Ins+GK); els quals havien incorporat ambdós gens (Figura 1).

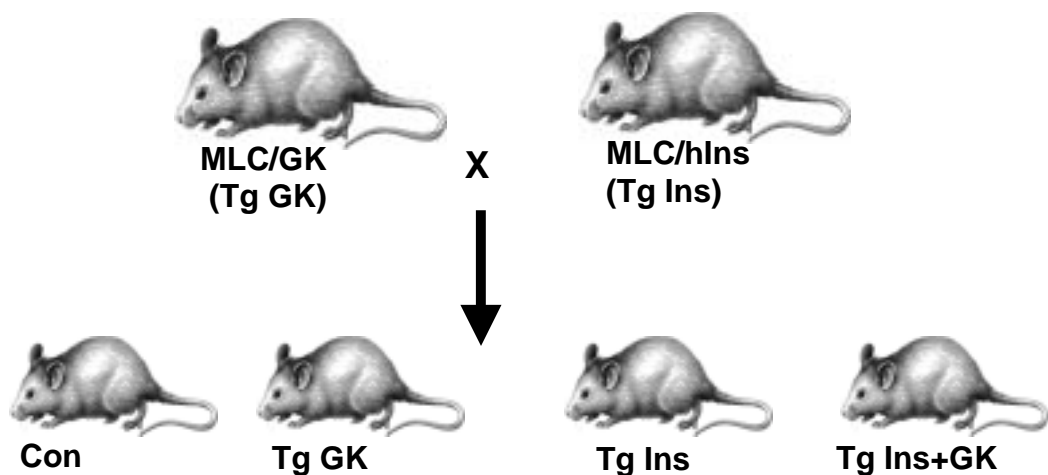


Figura 1. Obtenció dels ratolins doble transgènics MLC/Ins+GK. Esquema representatiu de la descendència obtinguda dels encreuaments realitzats entre les línies de ratolins transgènics MLC/hIns i MLC/GK per tal d'obtenir ratolins doble transgènics MLC/hIns+GK.

enzims de restricció *Hind* III (detecció d'Insulina) o *Eco*R I (detecció de GK). Els productes de la digestió es van separar mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa i es van transferir a una membrana de nitrocel.lulosa. Posteriorment, es van hibridar amb les sondes d'insulina o glucoquinasa tal i com s'indica en els *Materials i Mètodes*.

1.1.2. Anàlisi de l'expressió del transgèn.

Per comprovar si en els ratolins doble transgènics es mantenia l'expressió dels gens quimèrics MLC/hIns i MLC/GK, es va obtenir RNA total de múscul esquelètic de les diferents línies de ratolins de 8 setmanes d'edat. L'expressió d'insulina i de glucoquinasa a múscul es va analitzar per *Northern Blot*. Un cop l'RNA es va transferir a la membrana, aquesta es va hibridar utilitzant com a sonda el cDNA de la glucoquinasa i el cDNA de la insulina humana. Únicament es va detectar presència d'mRNA del gen de la insulina humana en els ratolins Tg Ins i en els Tg Ins+GK, mentre que l'expressió del gen de la insulina en els ratolins control i els Tg GK era absent (Figura 3). Respecte a l'expressió de la glucoquinasa, únicament s'observà la presència d'mRNA en els ratolins Tg GK i en els ratolins Tg Ins+GK (Figura 3).

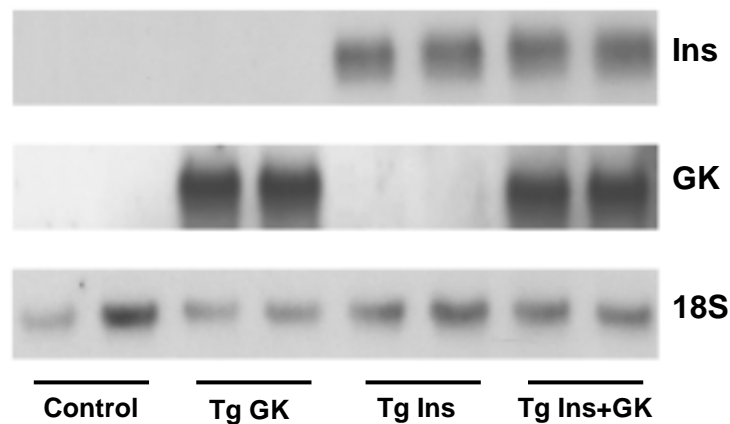


Figura 3. Anàlisi de l'expressió dels gens quimèrics MLC/hIns i MLC/GK en els ratolins doble transgènics. Es van utilitzar 15 µg de RNA total de múscul esquelètic de ratolins control, Tg Ins, Tg GK i Tg Ins+GK. Es va mesurar l'expressió per *Northern Blot*, tal i com s'indica a *Materials i Mètodes*.

1.1.3. Corba de tolerància a la Glucosa.

Per determinar si l'expressió conjunta del gen de la insulina i la glucoquinasa per part del múscul esquelètic tenia algun efecte sobre el metabolisme de la glucosa *in vivo*, es

va realitzar un test de tolerància al sucre a ratolins control i doble transgènics de 2-3 mesos d'edat. Per això, els ratolins es van dejunar durant 16 h, i posteriorment se'ls va administrar un bolus intraperitoneal de glucosa i es va anar mesurant els nivells de glucosa en sang al llarg del temps. A l'inici del test, els nivells basals de glucèmia en els ratolins control i doble transgènics no eren significativament diferents. Seguidament a l'administració de glucosa, la glucèmia dels animals va incrementar en tots els grups. No obstant, els ratolins doble transgènics van mostrar, al llarg del test, uns nivells de glucosa en sang inferiors als dels ratolins control. Aquest resultat suggeria que la producció d'insulina i glucoquinasa per part del múscul millorava, molt probablement, la captació i l'eliminació de glucosa circulant, el que donava lloc a una resposta més eficient davant de canvis en la concentració de glucosa en sang (Figura 4).

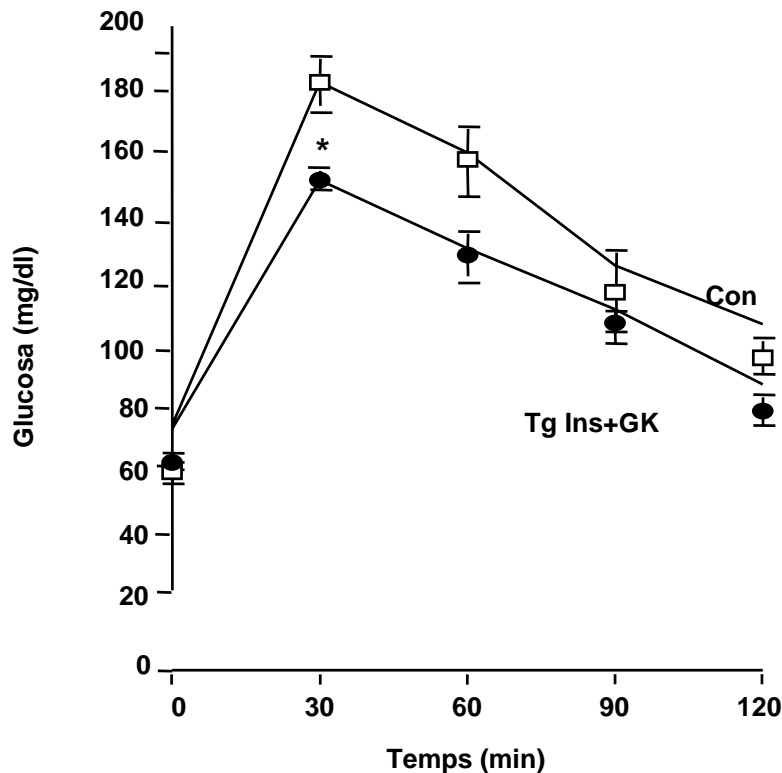


Figura 4. Corba de tolerància a la glucosa dels animals doble transgènics que expressaven insulina i glucoquinasa a múscul esquelètic. Ratolins doble transgènics (Tg Ins+GK) i control (Con) dejunats van ser anestesiats i sotmesos a un test de tolerància a la glucosa. Aquest es va realitzar mitjançant una injecció intraperitoneal del sucre (0.5 mg/g de pes viu) a temps 0. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 8 ratolins per grup. * $p < 0.05$ vs Con.

1.2. EFECTE DE L'EXPRESSION D'INSULINA I DE GLUCOQUINASA EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC SOBRE EL DESENVOLUPAMENT DE DIABETIS EN ANIMALS TRACTATS AMB ESTREPTOZOTOCINA.

Donat que els animals doble transgènics presentaven una resposta millorada davant de canvis en la concentració de la glucosa en sang, es va estudiar si l'expressió d'insulina i glucoquinasa per part del múscul esquelètic podia revertir l'estat diabètic. Amb aquest objectiu es va induir diabetis experimental mitjançant l'administració de 5 dosis de 45 mg/kg d'estreptozotocina (Stz). Aquest tractament dóna lloc a la destrucció de les cèl·lules β del pàncrees amb el consegüent desenvolupament de diabetis.

1.2.1. Efecte de la coexpressió de la insulina i la glucoquinasa en el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica.

El desenvolupament d'hiperglucèmia és un dels trets principals de la diabetis. Per aquest motiu, es va analitzar si l'expressió conjunta d'insulina i de glucoquinasa per part del múscul esquelètic era capaç de revertir-la.

Es van comparar les glucèmies en alimentació assolides pels ratolins transgènics (Tg Ins i Tg GK) i els ratolins doble transgènics (Tg Ins+GK) 6 setmanes després del tractament amb Stz. Els ratolins transgènics i doble transgènics varen presentar uns nivells de glucosa en sang significativament inferiors als observats en els ratolins control diabètics (Stz Con) (Figura 5). No obstant, tot i que els Tg Ins i els Tg GK tractats amb Stz presentaven una reducció dels nivells de glucosa en sang, aquests animals romanien hiperglucèmics. En canvi, es va observar que la reducció de la glucèmia era molt més important en els ratolins que expressaven conjuntament els gens de la insulina i de la glucoquinasa en el múscul ja que assolien uns nivells de glucosa en sang pràcticament normalitzats (Figura 5). La correcció de la hiperglucèmia en els ratolins doble transgènics va ser evident al llarg de tot l'estudi; fins a 4 mesos després del tractament amb Stz (Figura 6).

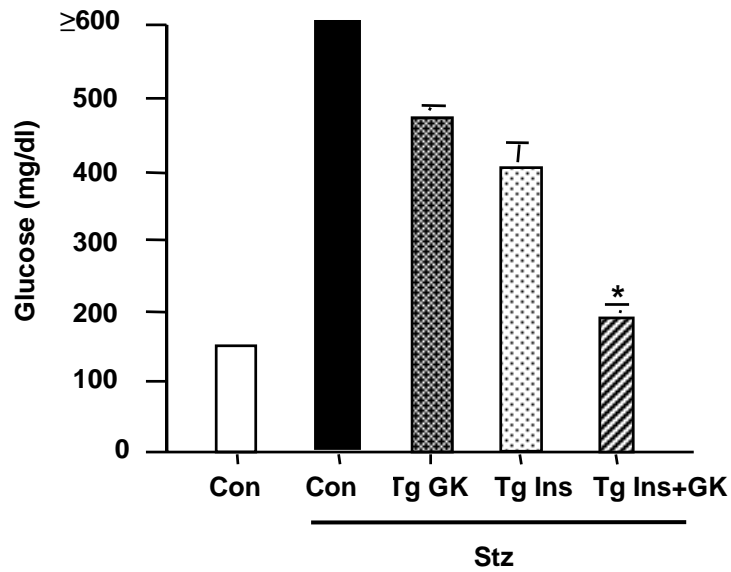


Figura 5. Efecte de la coexpressió d'insulina i de glucoquinasa en el múscul esquelètic. Es va analitzar la glucèmia en alimentació de ratolins control sans i de ratolins control, de transgènics (Tg Ins i Tg GK) i de doble transgènics (Tg Ins+GK) sis setmanes després de la inducció de diabetis amb Stz. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 8 animals per grup. * $p < 0.05$ vs Stz-Con.

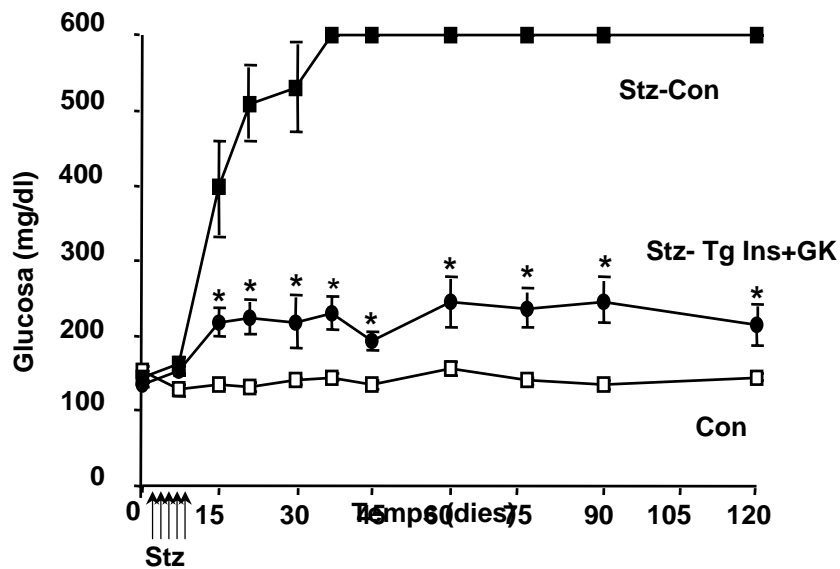


Figura 6. Evolució de la glucèmia en alimentació en els ratolins doble transgènics Tg Ins+GK. El resultat són la mitjana \pm SEM de 10 animals per grup. * $p < 0.05$ vs Stz-Con.

També es va estudiar quin era l'efecte de la coexpressió d'insulina i de glucoquinasa respecte al desenvolupament d'hiperglucèmia en animals dejunats. Així, es va determinar la glucèmia dels diferents grups d'animals després de 12 hores de dejuni. Els ratolins control tractats amb Stz eren clarament hiperglucèmics. En canvi, els ratolins transgènics que expressaven insulina o glucoquinasa presentaven una pràctica normalització de la glucèmia. Els ratolins doble transgènics varen presentar una completa correcció de la hiperglucèmia assolint uns nivells de glucèmia equivalents a la dels ratolins control sans (Figura 7). La reversió de la hiperglucèmia en dejú es va mantenir al llarg dels 4 mesos posteriors a la inducció de diabetis amb Stz (Figura 8).

Aquests resultats suggerien que la insulina i la glucoquinasa actuaven de manera cooperativa en el múscul esquelètic augmentant la capacitat d'aquest d'eliminar la glucosa circulant. Això permetia revertir el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica tant en alimentació com en dejuni.

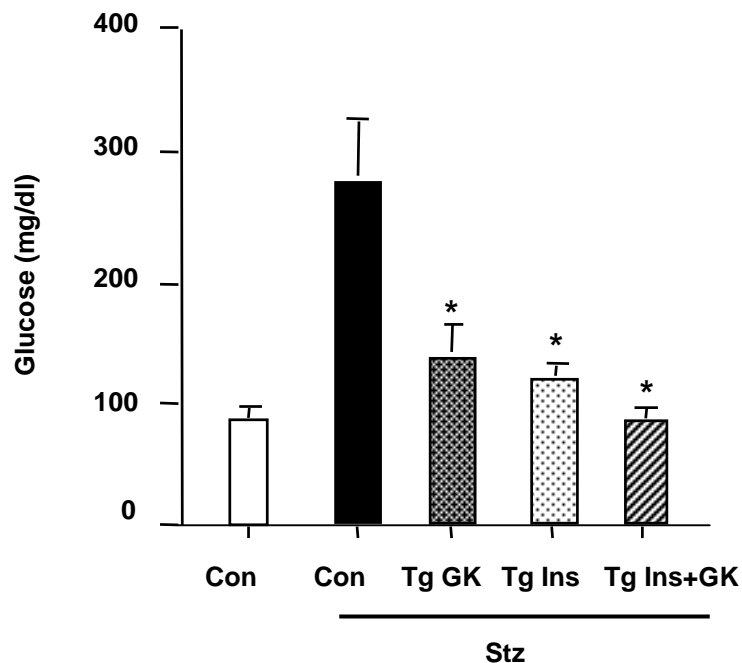


Figura 7. Efecte de la coexpressió d'insulina i de glucoquinasa en el múscul esquelètic sobre la glucèmia en dejú d'animals diabètics. Es va analitzar la glucèmia en dejuni de ratolins control sans i de ratolins control, transgènics (Tg Ins i Tg GK) i doble transgènics (Tg Ins+GK) sis setmanes després de la inducció de diabetis amb Stz. La glucèmia es va determinar després d'un dejuni de 12h. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 8 animals per grup. * $p < 0.05$ vs Stz-Con.

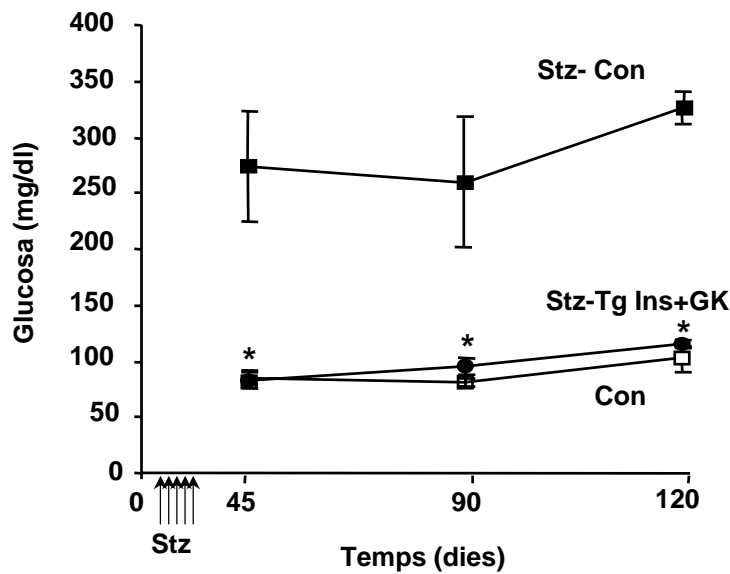


Figura 8. Evolució de la glucèmia en dejú en els ratolins doble transgènics (Tg Ins+GK). Els resultats són la mitjana \pm SEM de 10 animals per grup. * $p < 0.05$ vs. Stz-Con.

1.2.2. Els ratolins doble transgènics no desenvolupaven hipoglucèmia.

Un dels principals problemes del tractament substitutori amb injeccions múltiples d'insulina és l'aparició d'episodis d'hipoglucèmia. S'ha descrit que la teràpia intensiva amb insulina, tot i permetre obtenir un millor control de la glucèmia, duu associat un elevat risc d'episodis d'hipoglucèmia (DCCT, 1993). Per tal d'examinar si l'expressió conjunta d'insulina i de glucoquinasa donava lloc a episodis d'hipoglucèmia, es van dejunar els animals durant un període de 24 hores. Durant aquest període es va observar una reducció dels nivells de glucosa en sang en tots els grups. Transcorregudes les primeres 12 hores del dejuni, es va observar que la glucèmia assolida pels ratolins doble transgènics no era significativament diferent a la que presentaven els ratolins sans i en cap moment posterior (fins a les 24 hores) es va observar una situació d'hipoglucèmia (Figura 9). En canvi, els ratolins controls tractats amb Stz presentaven una glicèmia a les 24 hores de dejú característica d'un estat diabètic (Figura 9).

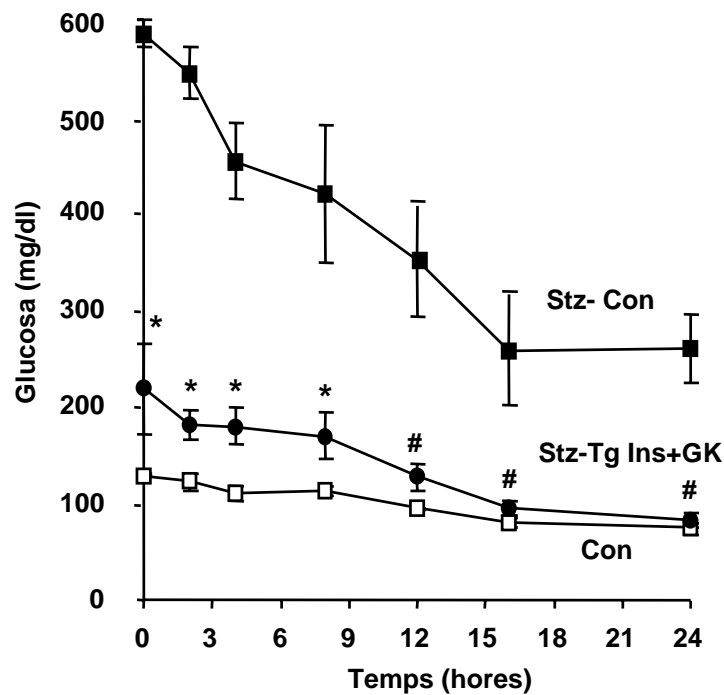


Figura 9. Evolució de la glucèmia durant un dejuni de 24 hores en els ratolins doble transgènics (Tg Ins+GK). Els resultats són la mitjana \pm SEM de 10 animals per grup. * $p < 0.05$ vs Stz-Con i Con. # $p < 0.05$ vs Stz-Con.

1.2.3. Estudi de la insulinèmia en els animals tractats amb Stz.

Estudis realitzats amb ratolins Tg Ins van mostrar que la producció d'insulina per part del múscul esquelètic permetia contrarestar la disminució dels nivells circulants de l'hormona com a conseqüència del desenvolupament de l'estat diabètic (Riu, 2002). Per això, vàrem determinar la insulinèmia per radioimmunoassaig en mostres de sèrum procedents de ratolins control sense tractar amb Stz, i en mostres procedents de ratolins controls i doble transgènics diabètics. Els ratolins control tractats varen presentar una disminució d'aproximadament el 70% de la seva insulinèmia, mentre que els ratolins doble transgènics varen presentar, únicament, una disminució del 30% respecte als nivells observats en els ratolins control sans, assolint uns nivells 2 vegades superiors als dels ratolins control tractats amb Stz (Figura 10). Aquest increment de la insulinèmia en els ratolins doble transgènics es devia, molt probablement, a la producció d'insulina per part del múscul esquelètic i s'assolien valors que eren similars als observats en els ratolins Tg Ins (Riu, 2002).

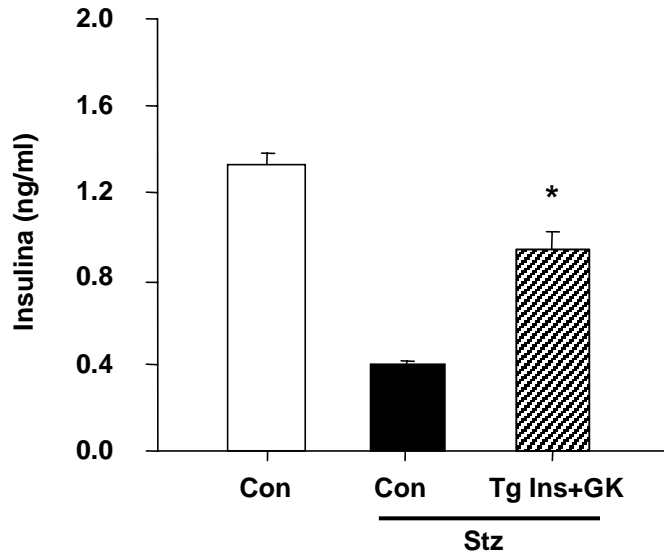


Figura 10. Nivells d'insulina en sang dels ratolins control, dels doble transgènics tractats amb Stz i dels ratolins control sense tractar. Els nivells d'insulina en sang es van determinar per radioimmunoassaig, tal i com s'indica en els *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 10 animals per grup * $p < 0.05$ vs Con.

1.2.4. Estudi d'altres paràmetres sèrics en els animals tractats amb Stz.

Posteriorment es va estudiar si la normalització en la glucèmia i la millora de la insulinèmia també estava acompanyada de la normalització d'altres paràmetres sèrics que normalment estan alterats en diabetis. La reducció dels nivells d'insulina en sang dona lloc a una alteració del metabolisme lipídic, tant en el fetge com en el teixit adipós. En el teixit adipós, l'absència d'insulina produeix un augment de la lipòlisi, el que incrementa els nivells circulants d'àcids greixosos lliures. Similarment, la falta d'insulina dona lloc a una reducció de la captació de triglicèrids per part del teixit adipós i n'incrementa els nivells sèrics. Per altra banda, els àcids greixosos lliures són oxidats en el fetge per tal de produir cossos cetònics, els quals s'alliberen a la sang i donen lloc a cetoacidèmia. Per aquesta raó, es van determinar els nivells de triglicèrids, d'àcids greixosos lliures (NEFAS) i de β -hidròxidbutirat en mostres de sèrum de ratolins control sense tractar i de ratolins control i doble transgènics tractats amb Stz. Els animals control tractats amb Stz varen presentar uns nivells molt elevats de cossos cetònics, d'àcids greixosos i de triglicèrids. En canvi, els ratolins doble transgènics presentaven una pràctica normalització dels diferents paràmetres sèrics (Taula 1). Aquests resultats suggerien que, molt probablement, la producció d'insulina per part

del múscul actúaria sobre el teixit adipós i el fetge, fet que evitaria el desenvolupament de les alteracions metabòliques característiques de la diabetis.

Taula 1. Determinació dels paràmetres sèrics.

	NEFAS (mM)	β -hidròxidbutirat (mmol/l)	Triglicèrids (mg/dl)
Control	0,81±0,05	0,57±0,07	119,5±13
Stz-Control	1,22± 0,02	0,95±0,09	299,5±23
Stz- Tg Ins+GK	0,79±0,08 *	0,60±0,05 *	125,9±12*

Taula 1. Es va determinar la concentració de β -hidròxidbutirat, d'àcids greixosos lliures i de triglicèrids en el sèrum dels ratolins control sense tractar i en el dels ratolins control i doble transgènics tractats amb Stz, tal com s'indica en els *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 10 animals per grup. *p<0.05 vs Stz-Con .

1.2.5. Test de tolerància a la glucosa.

Amb la finalitat d'estudiar com responien els ratolins doble transgènics a canvis bruscs en la glucèmia basal, es va realitzar un test de tolerància a la glucosa tres mesos després de la inducció de diabetis amb Stz. Prèviament a l'administració del bolus de glucosa es van dejunar els animals durant 16 hores. A l'inici de l'experiment, ja s'observaven diferències significatives en la glucèmia basal. Els ratolins control tractats amb Stz eren clarament hiperglicèmics (326±14 mg/dl), mentre que els ratolins dobles transgènics tractats amb Stz presentaven una glucèmia similar a la dels ratolins control normal (Stz-Tg Ins+GK: 115±4 mg/dl vs. Con: 102±12 mg/dl). Als 15 minuts d'administrar el bolus de glucosa, la glucèmia va incrementar en els tres grups d'animals. Durant el temps que va durar l'experiment, els ratolins control tractats amb Stz no van recuperar mai els seus nivells basals i van presentar sempre uns nivells superiors al límit de detecció de l'aparell. En canvi, els ratolins doble transgènics tractats amb Stz, a l'igual que els ratolins control, varen disminuir la seva glucèmia fins

a assolir, 3 hores després de l'administració de la glucosa, uns nivells equivalents als observats a l'inici de l'experiment (Figura 11).

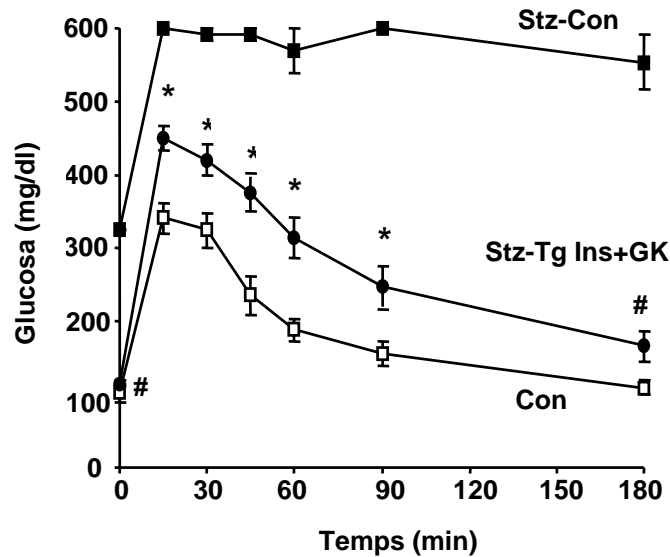


Figura 11. Test de tolerància intraperitoneal de glucosa. Ratolins doble transgènics i controls tractats amb Stz i ratolins controls no tractats dejunats van ser sotmesos a un test de tolerància a la glucosa. Aquest es va realitzar mitjançant una injecció intraperitoneal del sucre (1 mg/g de pes viu) a temps 0. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 6 ratolins per grup. * $p < 0.05$ vs Stz-Con & Con. # $p < 0.05$ vs Stz-con.

1.2.6. Consum d'aigua i de menjar.

Donat que l'expressió d'insulina i de glucoquinasa en els ratolins doble transgènics produïa una recuperació de la insulinèmia, així com una pràctica normalització de la glucèmia i altres paràmetres sèrics, es va estudiar quin era el seu efecte sobre l'estat general dels animals. Per això es va determinar el consum d'aigua (polidípsia) i de menjar (polifàgia) en els ratolins control normals i en els ratolins control i doble transgènics tractats amb Stz. Un mes després de la inducció de diabetis, els ratolins control tractats amb Stz havien incrementat, aproximadament, 8 vegades el seu consum d'aigua, mentre que el consum d'aigua en els ratolins doble transgènics era normal (Figura 12A). Durant el temps que va durar l'experiment, es va observar que el consum d'aigua dels ratolins doble transgènics es mantenia dins de la normalitat, a diferència dels ratolins control tractats, en els quals la polidípsia va continuar incrementant (Figura 12A). Paral·lelament al consum d'aigua, es va mesurar el consum

de menjar dels ratolins control i doble transgènics, així com dels ratolins controls sense tractar. De la mateixa manera que en el consum d'aigua, un mes després del tractament amb Stz, el consum de menjar dels ratolins controls diabètics havia incrementat aproximadament unes 3 vegades respecte al consum de menjar d'un ratolí control sa i va continuar augmentant a mesura que s'anava desenvolupant la hiperglucèmia (Figura 12B). En canvi, en els ratolins doble transgènics el consum de menjar era pràcticament normal durant tot el temps que va durar l'experiment (Figura 12B).

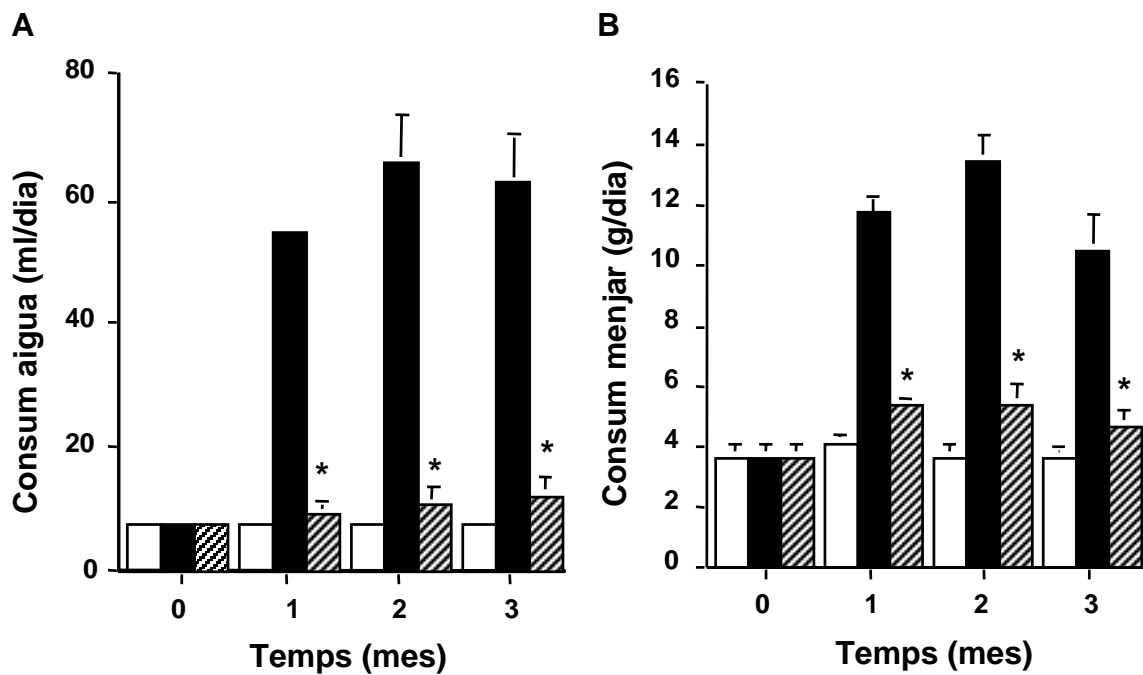


Figura 12. Evolució del consum d'aigua (A) i de menjar (B) en els ratolins doble transgènics tractats amb Stz. El consum d'aigua i de menjar es va determinar en animals individualitzats, tal com s'indica en els *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 6 animals per grup. * $p < 0.05$. vs Stz-Con. Con □, Stz-Con ■, Stz-Tg Ins+GK ▨

1.2.7. Efecte de l'expressió local d'insulina i de glucoquinasa sobre el metabolisme de la glucosa en el múscul esquelètic.

Els resultats obtinguts en la glucèmia i en la insulinèmia suggerien que els transgens d'insulina i de glucoquinasa s'expressaven durant la diabetis. Per això, es va obtenir RNA total de múscul esquelètic i es va analitzar l'expressió d'ambdós transgens en ratolins control i doble transgènics tractats amb Stz, i en els ratolins control sense

tractar. Transcorreguts 4 mesos des de la inducció de diabetis, els ratolins doble transgènics continuaven expressant uns nivells elevats d'insulina i de glucoquinasa similars als observats en els ratolins doble transgènics sense tractar (Figura 13).

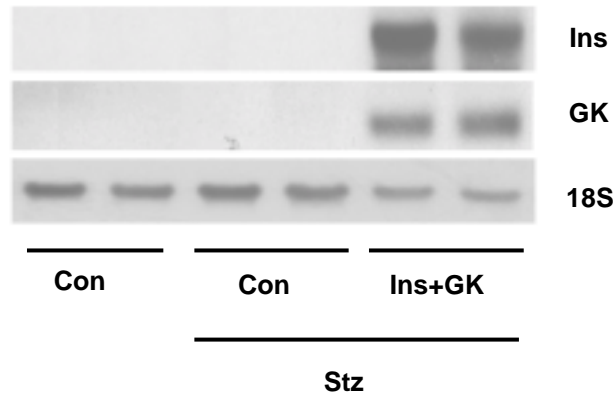


Figura 13. Expressió dels gens quimèrics MLC/Insulina i MLC/Glucoquinasa en múscul esquelètic d'animals tractats amb Stz. Es van utilitzar 15 µg de RNA total de múscul de ratolins controls i doble transgènics tractats amb Stz i ratolins controls sense tractar. Es va mesurar l'expressió de la insulina i de la glucoquinasa per *Northern blot* tal i com s'indica en els *Materials i Mètodes*.

L'absència d'insulina 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 de proteïna del transportador de glucosa GLUT-4. Per aquest motiu, es va analitzar el contingut de proteïna GLUT-4 a múscul a partir d'una preparació de membranes totals. Al cap de 4 mesos de la inducció de la diabetis, el contingut de proteïna GLUT4 havia disminuït en els ratolins control tractats amb Stz, mentre que en el cas dels ratolins doble transgènics els nivells observats eren pràcticament equivalents als dels ratolins control normal sense tractar (Figura 14).

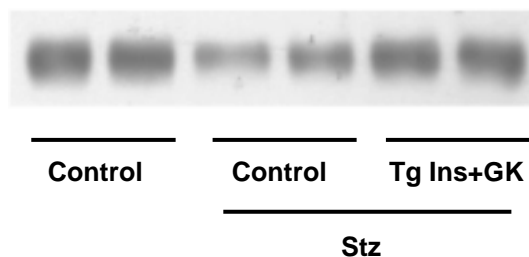


Figura 14. Expressió del transportador GLUT-4 en múscul esquelètic. Es van obtenir membranes totals a partir de músculs quàdriceps i gastrocnemius de ratolins control sans i ratolins control i doble transgènics diabètics. Les proteïnes de membrana es van carregar a un gel i, després de la transferència, es va determinar el contingut de GLUT-4 per immunodetecció, tal i com s'indica als *Materials i Mètodes*.

Posteriorment, es va estudiar si l'expressió constitutiva d'insulina i de glucoquinasa podia contrarestar les alteracions produïdes en les vies metabòliques relacionades amb la utilització i l'emmagatzemament de glucosa en el múscul esquelètic. Per aquest motiu, es van estudiar els nivells de glucosa-6-fosfat (G-6-P) i de glucogen a múscul dels ratolins control i Tg Ins+GK tractats amb Stz, i dels ratolins control normals. Els ratolins control tractats amb Stz presentaven una disminució d'aproximadament un 30% en la concentració de G-6-P respecte els ratolins control. En canvi, els ratolins Tg Ins+GK tractats amb Stz presentaven una recuperació dels nivells de G-6-P i assolien una concentració similar a l'observada en els ratolins control sans (Taula 2). De la mateixa manera, el múscul dels animals Tg Ins+GK tractats amb Stz presentava una major acumulació de glucogen que els ratolins control diabètics i es van detectar uns nivells de glucogen similars als observats en els ratolins control sense tractar (Taula 2). Tot això suggeria que l'expressió constitutiva d'insulina i de glucoquinasa per part del múscul esquelètic afavoria el restabliment de les vies metabòliques implicades en la utilització i en l'acumulació de la glucosa.

Taula 2. Determinació dels nivells de G-6-P i glucogen a múscul esquelètic.

	Glucosa-6-fosfat ($\mu\text{mol/g}$)	Glucogen (mg/g)
Control	0,35 \pm 0,03	2,15 \pm 0,22
Stz-Control	0,24 \pm 0,03	1,35 \pm 0,24

Stz-Tg Ins+GK	0,36± 0,03 *	1,98± 0,22*
----------------------	---------------------	--------------------

Les determinacions dels nivells de metabòlits del metabolisme de la glucosa a nivell muscular es van realitzar en extractes de múscul de ratolins control (Control), de ratolins controls tractats amb Stz (Stz-Control) i de ratolins transgènics tractats amb Stz (Stz-Dtransg.), tal i com s'indica en l'apartat de *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 6 animals en cada grup. * $p < 0.05$ vs Stz-Control.

1.2.8. L'efecte de l'expressió d'insulina i de glucoquinasa sobre el metabolisme hepàtic de la glucosa.

Amb la finalitat de determinar si la insulina produïda pel múscul esquelètic podria estar actuant sobre la resta de l'organisme, es va estudiar la utilització i l'acumulació de glucosa en el fetge dels ratolins tractats amb Stz. Per aquest motiu, es va examinar el nivell d'expressió dels enzims claus en el control del flux de les vies metabòliques involucrades en la utilització i en la producció de glucosa en el fetge, els quals són regulats per insulina.

L'absència d'insulina en l'estat diabètic i, per tant, l'increment de la relació glucagó/insulina dóna lloc a un augment en l'activitat de la via gluconeogènica que provoca un increment de la producció hepàtica de glucosa. La P-enolpiruvatcarboxiquinasa (PEPCK) és el principal enzim regulador de la via gluconeogènica i la seva expressió és major durant la diabetis. Per tant, es va determinar si la producció d'insulina en els ratolins Tg Ins+GK diabètics podia revertir la inducció de l'expressió de la PEPCK a fetge. Com es pot observar en la Figura 15, els ratolins control tractats amb Stz varen presentar una expressió molt elevada de la PEPCK, mentre que els nivells d'expressió observats en els ratolins Tg Ins+GK eren pràcticament similars als d'un ratolí control sa (Figura 16).

El transport i la fosforilació de la glucosa són els passos inicials en la utilització de la glucosa per part del fetge. S'ha descrit que la fosforilació de la glucosa per la GK és la responsable de regular la utilització del sucre per part d'aquest teixit. Durant la diabetis, l'expressió de la GK és molt baixa i, per tant, el fetge és incapaç de

metabolitzar la glucosa sanguínia. Per aquest motiu, es va analitzar a partir del RNA total del fetge els nivells d'expressió de la GK hepàtica. Els ratolins control tractats amb Stz varen presentar uns nivells d'expressió de la GK molt disminuïts. En canvi, els ratolins Tg Ins+GK diabètics van presentar una recuperació dels nivells d'expressió de l'enzim (Figura 15).

Aquests resultats suggerien que la insulina produïda pel múscul esquelètic podia actuar en el fetge i que incrementava la utilització i inhibia la producció hepàtica de glucosa.

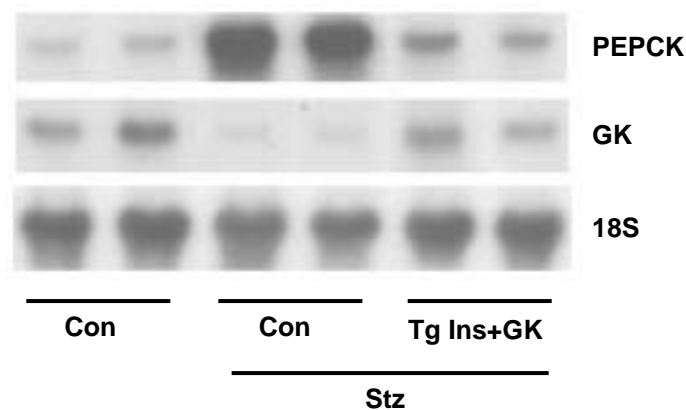


Figura 15. Expressió de PEPCK i GK a fetge. Per *Northern blot* del RNA total del fetge, es va determinar l'expressió de gens dels enzims claus en la captació i la utilització de glucosa, així com dels gens dels enzims implicats en la producció hepàtica del sucre (PEPCK). Aquesta anàlisi va realitzar-se tant en ratolins control sans com en ratolins control i doble transgènics tractats amb Stz. Es mostra un *Northern blot* representatiu hibridat amb les sondes específiques per a PEPCK i GK.

2.1. ELECTROTRANSFERÈNCIA DE DNA A MÚSCUL ESQUELÈTIC.

Mitjançant la utilització de ratolins doble transgènics es va observar que l'expressió conjunta d'insulina i de glucoquinasa per part del múscul esquelètic podia ser una bona aproximació terapèutica per al tractament de la diabetis de tipus 1. Amb aquesta finalitat es va procedir a aplicar aquesta nova aproximació a ratolins diabètics mitjançant la utilització d'estratègies de teràpia gènica no-viral. Entre els diferents mètodes existents, l'electrotransferència de DNA plasmídic en solució és una de les tècniques més eficaces per a la transferència de gens a múscul esquelètic. Per aquest motiu, prèviament a la transferència dels gens de la insulina i de la glucoquinasa, es va procedir a estudiar quina de les condicions d'electrotransferència que s'havien descrit en la bibliografia oferia una eficiència més elevada.

2.1.1. Comparació de les condicions d'electrotransferència.

Es van comparar les condicions d'electrotransferència descrites per *Mir L et al.* (Mir, 1998.) i *McMahon JM et al.* (McMahon, 2001.), utilitzant com a control de transferència la injecció directe de DNA plasmídic en solució. En la primera aproximació, la transferència de DNA a múscul esquelètic era òptima quan, posteriorment a la injecció del DNA plasmídic, s'aplicava un camp elèctric de 200V/cm, 8 polsos, 20 ms-1 per pols i 2 Hz de freqüència. En canvi, en la segona aproximació s'obtenia una major eficiència de transfecció quan, prèviament a l'electrotransferència es tractava el múscul amb una solució de hialuronidasa. A continuació s'injectava el DNA plasmídic i s'aplicava un camp elèctric de 175V/cm, 10 polsos, 20 ms i 1 Hz de freqüència. Ens referirem a aquest darrer mètode com +Hial, mentre que al primer l'anomenarem - Hial.

Per tal de decidir quina de les dues condicions seria la que utilitzaríem per a la transferència de DNA a múscul esquelètic es van considerar tres paràmetres: (1) el nivell de fibres musculars transfectades, (2) el dany tissular provocat i, (3) els nivells de proteïna produïda. En els diferents estudis realitzats es va transferir el gen de la β -galactosidasa (β -gal) o la proteïna verda fluorescent (GFP) sota el control del promotor del citomegalovirus (CMV).

Per determinar el nivell de fibres transfectades i el dany tissular produït en cadascuna de les condicions estudiades, es va transferir el plàsmid que contenia el gen CMV/GFP a varis grups de 3 ratolins de 8 setmanes d'edat. En totes les condicions analitzades la quantitat de DNA plasmídic injectada va ser de 75 µg i el múscul injectat va ser el *Tibialis anterior*. S'utilitzà el *Tibialis anterior* perquè és senzill d'injectar percutàniament, perquè el dany muscular produït pel procediment d'injecció no afectava significativament la locomoció del ratolí i perquè els elèctrodes podien ser col·locats adequadament a ambdues bandes del múscul. Cinc dies després de la injecció de DNA, els ratolins van ser sacrificats i els músculs es van extreure i incloure en parafina per al seu posterior estudi histològic. Mitjançant la detecció per fluorescència de la proteïna GFP es va poder observar el nivell de fibres musculars que havien estat transfectades amb cadascuna de les condicions. Únicament es va detectar fluorescència de la proteïna GFP en els músculs dels ratolins que havien estat electrotransferits, no obstant això, el nombre de fibres transfectades era significativament diferent segons les condicions del camp elèctric utilitzat. Els músculs electrotransferits sense hialuronidasa mostraven, aproximadament, un 30% de fibres positives per la proteïna GFP, mentre que amb hialuronidasa el nombre de fibres transfectades eren, aproximadament, el 80% (Figura 15).

Els talls seriatos dels músculs transferits amb el plàsmid que contenia el gen CMV/GFP van ser tenyits mitjançant hematoxilina-eosina per analitzar el dany muscular produït. 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. La morfologia de les cèl·lules musculars en el cas de la injecció de DNA en solució i l'electrotransferència amb hialuronidasa eren similars a les d'un múscul sense tractar; fibres musculars amb nuclis perifèrics però que, tanmateix, presentaven un grau mínim d'infiltració limfocitària (Figura 16). No obstant, aquesta infiltració havia desaparegut completament 15 dies després de la transferència del DNA (resultats no mostrats). En canvi, en el cas de l'electroporació sense hialuronidasa, aproximadament el 80% de les fibres musculars presentaven nuclis centrals juntament amb una infiltració limfocitària severa. En aquest cas, l'elevat dany tissular es devia, molt probablement, al camp elèctric aplicat, que és el factor determinant del grau de permeabilització de la membrana (Figura 16).

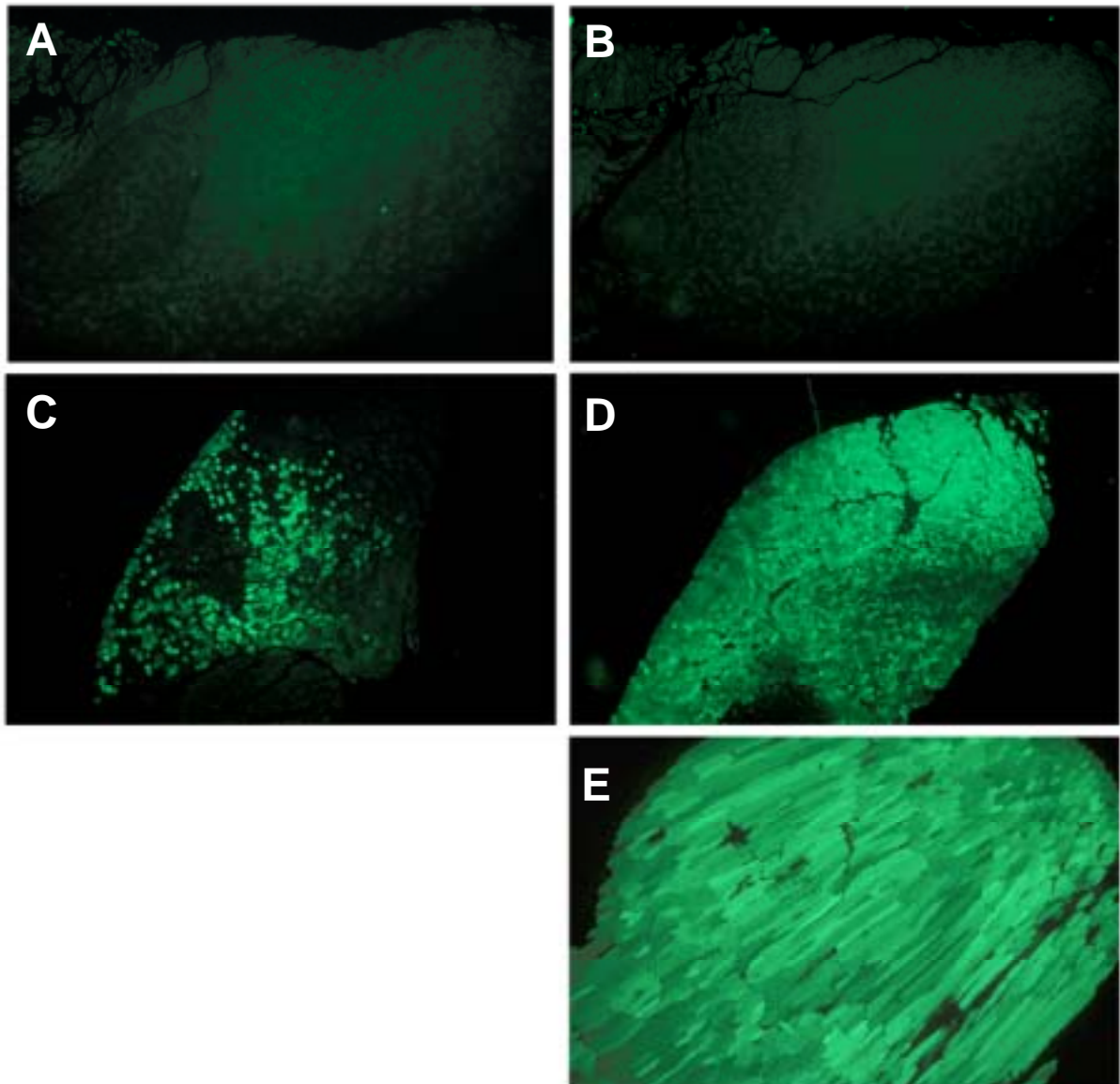


Figura 15. Electrotransferència del *tibialis anterior* amb un plàsmid CMV/GFP. Es va determinar el nivell de fibres musculars transfectades en cadascuna de les diferents condicions estudiades. Els músculs van ser fixats i inclosos en parafina per a realitzar-ne un estudi histològic mitjançant la detecció per fluorescència de la proteïna GFP (A) Múscul control sense injectar. (B) Múscul injectat amb DNA plasmídic en solució. (C) Múscul electrotransferit sense hialuronidasa (D) múscul electrotransferit amb hialuronidasa (Secció transversal) (E) múscul electrotransferit amb hialuronidasa (Secció longitudinal). Amplificació: X40.

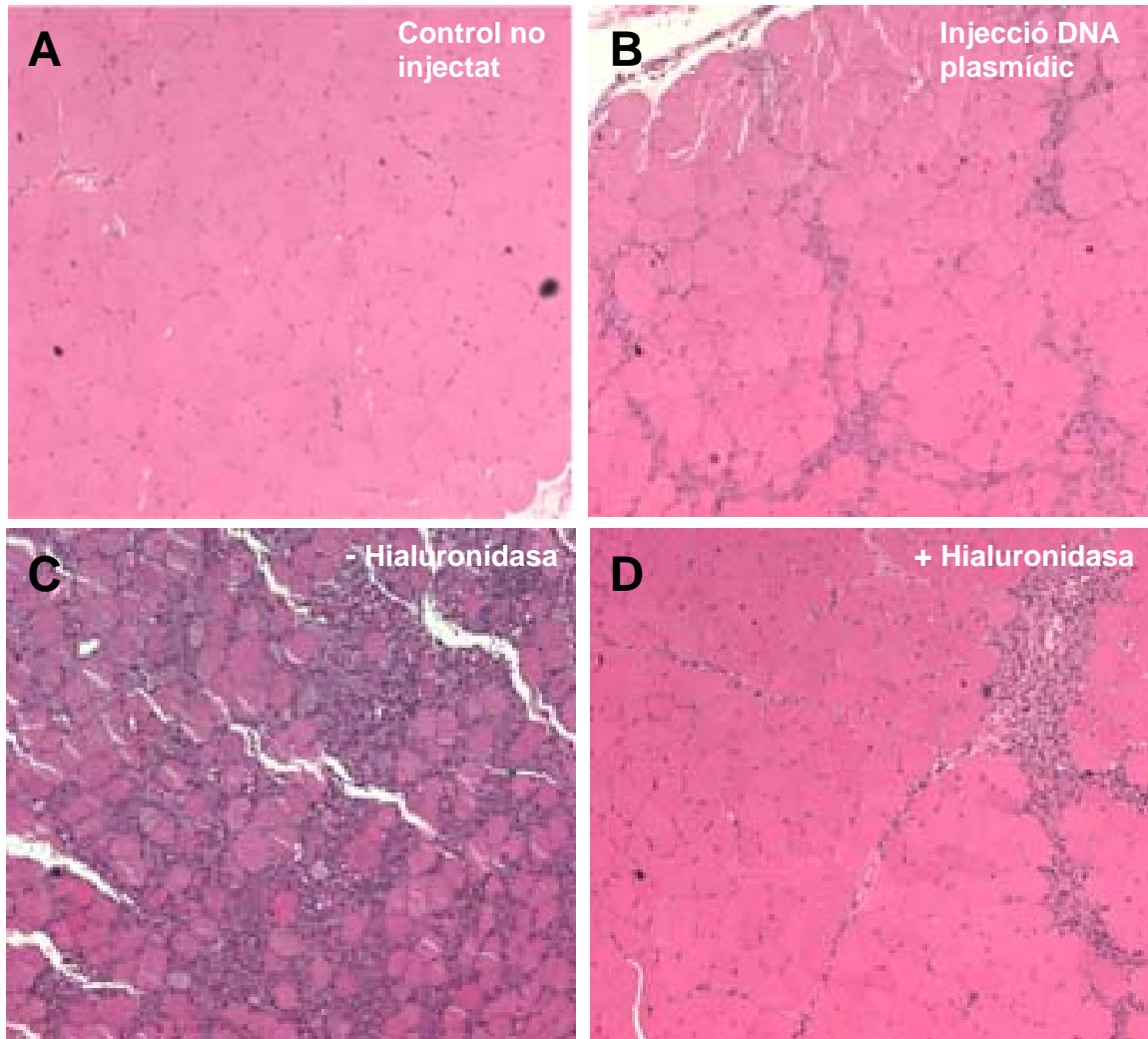


Figura 16: Anàlisi histològica dels músculs *tibialis* electrotransferits. Es mostren talls representatius dels músculs transferits amb el plàsmid CMV/GFP tenyits amb hematoxilina-eosina: **(A)** Múscul control sense injectar. **(B)** Múscul injectat amb DNA plasmídic en solució. **(C)** Múscul electrotransferit sense hialuronidasa. **(D)** Múscul electrotransferit amb hialuronidasa. Amplificació: X100.

Paral·lelament es va estudiar la quantitat de proteïna produïda després de l'electrotransferència amb o sense un tractament previ amb hialuronidasa. Per tal raó es va transferir el plàsmid amb el gen CMV/ β -gal a varis grups de 3 ratolins de 8 setmanes d'edat. De manera similar a l'experiment anterior, la quantitat de DNA plasmídic injectada va ser de 75 μ g i el múscul injectat va ser el *tibialis anterior*. Al cap de 5 dies després de la injecció del DNA, els ratolins van ser sacrificats i els músculs es van homogeneïtzar per mesurar la quantitat de proteïna β -gal produïda.

A tots els animals als quals se'ls va injectar DNA hi havia producció de la proteïna β -gal, la qual era més elevada en els grups d'animals que havien estat electrotransferits. Aquests resultats es corresponien amb els treballs descrits anteriorment on s'indicava que l'aplicació d'un camp elèctric incrementava entre 10 i 100 vegades l'eficiència de la transferència de DNA, fet que permetia al múscul esquelètic produir una major quantitat de proteïna (Mir, 1999; Bettan 2000). En comparar la quantitat de proteïna β gal en els músculs electrotransferits es va observar 10 vegades més quantitat de proteïna β -gal quan es realitzava l'electrotransferència amb hialuronidasa.

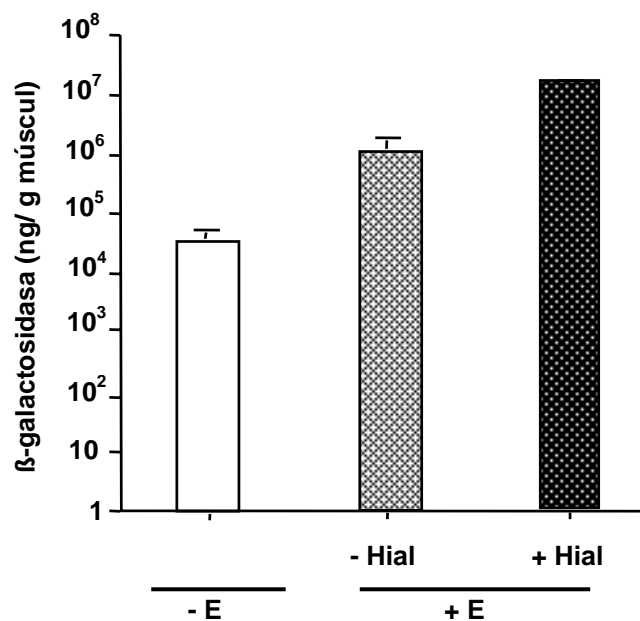


Figura 14. Quantitat de proteïna β -gal en múscul esquelètic després de la injecció de la solució de DNA plasmídic \pm Electrotransferència. Es va determinar la quantitat de proteïna β -gal produïda en els músculs *tibialis anterior* dels ratolins control als quals se'ls va electrotransferir el plàsmid amb el gen CMV/ β -gal. La quantitat de proteïna β gal es va determinar a partir d'homogenats musculars, tal i com es descriu en els *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 6 músculs per a cada condició. H, hialuronidasa. E, electrotransferència.

Per tant, l'electrotransferència amb hialuronidasa permetia: (1) transferir una major àrea muscular, (2) produir un mínim dany tissular, i (3) obtenir una major quantitat de proteïna produïda. Per aquest motiu, en estudis posteriors es va decidir utilitzar la tècnica d'electrotransferència amb pretractament amb hialuronidasa.

2.1.2. Estudi de l'efecte de la inducció de diabetis sobre l'eficiència de transferència de DNA a múscul esquelètic.

Posteriorment, es va estudiar si la inducció d'un estat diabètic podia afectar l'eficiència de l'electrotransferència de DNA al múscul esquelètic. Per aquest motiu, es va injectar el plàsmid que contenia el gen CMV/ β -gal a ratolins control sans i a ratolins control als quals se'ls havia induït diabetis experimental mitjançant la injecció intraperitoneal de Stz. Dotze dies després de la inducció de l'estat diabètic, es van injectar 75 μ g de DNA al múscul *tibialis anterior* dels dos grups de ratolins. En aquell moment, els ratolins diabètics presentaven uns nivells de glucosa en sang superiors als dels ratolins control normal (Figura 17 A). Al cap de 5 dies de la injecció del DNA, els ratolins van ser sacrificats i els músculs van ser obtinguts i homogeneïtzats per mesurar la quantitat de proteïna β -gal produïda. Com es pot observar en la Figura 17 B, els nivells de proteïna produïts en els ratolins control i en els ratolins diabètics no eren significativament diferents. Aquest fet indicava que, en l'estat diabètic, l'eficiència de l'electrotransferència no es veia afectada.

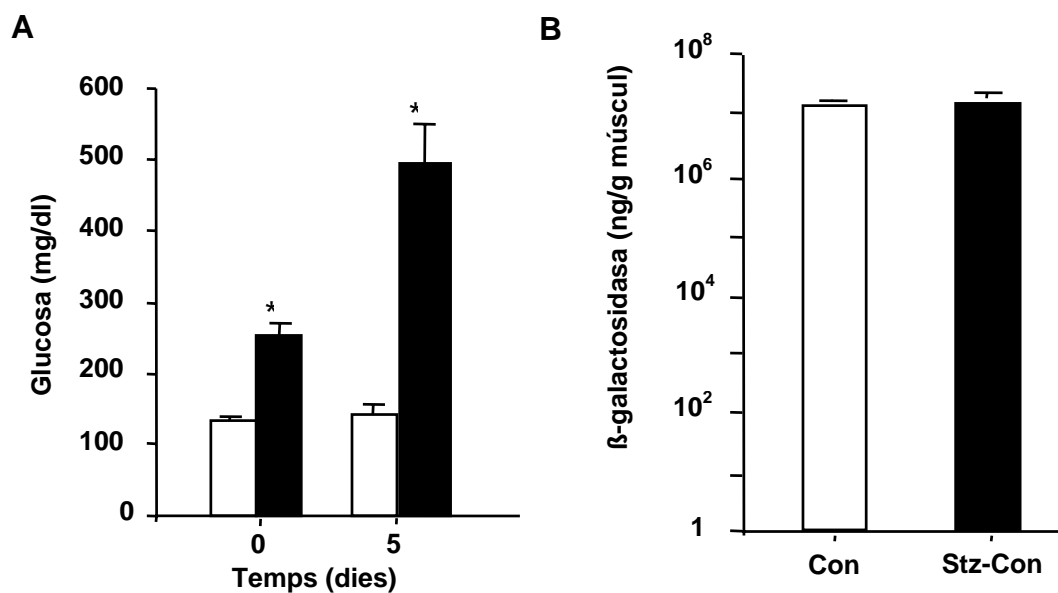


Figura 17: Estudi de l'efecte de la inducció de diabetis sobre l'eficiència de l'electrotransferència de DNA al múscul esquelètic. **(A)** Evolució de la glucèmia. La diabetis va ser induïda mitjançant el tractament de 5 dosis baixes de Stz a ratolins de 2 mesos d'edat. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 3 animals per grup. **(B)** Nivells de proteïna β -gal produïda. La quantitat de proteïna β -gal es va determinar 5 dies després de l'electrotransferència a partir d'homogenats musculars, tal i com es descriu als *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 6 músculs per a cada condició.

2.2. ELECTROTRANSFERÈNCIA A MÚSCUL ESQUELÈTIC DELS GENS QUIMÈRICS CMV/hIns i CMV/GK EN ANIMALS TRACTATS AMB ESTREPTOZOTOCINA.

Els estudis realitzats en ratolins doble transgènics (MLC/hIns+GK) van demostrar que l'expressió d'insulina i de glucoquinasa per part del múscul esquelètic permetia normalitzar la glucèmia, recuperar pràcticament els nivells d'insulina circulants, així com millorar significativament el metabolisme general dels ratolins diabètics. Això indicava que la transferència dels gens de la insulina i de la glucoquinasa a múscul podia esdevenir una teràpia alternativa als tractaments actuals de la DM1. Entre les diferents tècniques de teràpia gènica no virals per a la transferència de gens a múscul, l'electrotransferència de DNA plasmídic era la que oferia una millor eficiència, així com una baixa toxicitat i una fina regulació de la dosi a administrar. Per aquest motiu, es va procedir a electrotransferir els gens de la insulina mutada i de la glucoquinasa al múscul esquelètic de ratolins control diabètics.

2.2.1. Evolució de la glucèmia.

En primer lloc es va estudiar si un cop iniciat el procés diabètic, la transferència dels gens de la insulina i de la glucoquinasa en el múscul esquelètic podia revertir el desenvolupament de la hiperglucèmia.

Amb aquesta finalitat, es va induir diabetis experimental mitjançant 5 dosis de 45 mg/kg durant 5 dies consecutius a ratolins control de 8 setmanes d'edat, i es va mesurar l'evolució de la seva glucèmia. Quan els ratolins tractats amb Stz presentaven una glucèmia entre 250-300 mg/dl, es van dividir en dos grups i van ser electrotransferits. El grup control va ser electrotransferit amb el plàsmid que contenia el gen CMV/ β -gal (Stz-Con), mentre que el segon grup va ser electrotransferit amb els plàsmids que contenien els gens CMV/GK i CMV/Ins (Stz-Ins+GK). En tots dos grups, els músculs *tibialis anterior*, *quàdriceps* i *gastrocnemius* van ser electrotransferits amb 75 μ g de DNA plasmídic. Així, es va injectar a cada animal 225 μ g del plàsmid que contenia el gen CMV/hIns i 225 μ g del plàsmid que contenia el gen CMV/GK. A continuació, es va mesurar l'evolució dels nivells de glucosa en sang a tots els grups d'animals. Els ratolins control van continuar desenvolupant una hiperglucèmia severa

(Figura 18). En canvi, els ratolins que expressaven els gens de la insulina i de la glucoquinasa en el múscul esquelètic van disminuir la seva glucèmia durant les dues setmanes posteriors a l'administració del DNA. No obstant, tot i ser pràcticament normoglicèmics, els nivells de glucosa en sang obtinguts eren significativament diferents als nivells observats en els ratolins control sans (Figura 18). Això feia pensar que la "dosi gènica" d'insulina i glucoquinasa no era suficient per contrarestar la hiperglucèmia diabètica. Per aquest motiu, 15 dies després de la primera electrotransferència es va realitzar una segona electrotransferència a una part dels ratolins que ja havien estat electrotransferits prèviament (Figura 18). Tots els ratolins que van ser electrotransferits per segona vegada varen disminuir la seva glucèmia fins assolir uns nivells de glucosa en sang completament normoglicèmics. Aquests animals varen mantenir la normoglicèmia fins a unes 3 setmanes després de rebre el segon tractament, moment en què van ser sacrificats (Figura 18). A diferència dels ratolins que varen rebre una segona electrotransferència, els ratolins que únicament havien rebut una sola dosi, tot i no assolir uns nivells de glucosa en sang completament normoglicèmics, van mantenir una glucèmia pròxima a la normoglicèmia (Figura 18).

Aquests resultats ens suggerien que, una vegada iniciat el procés diabètic, la modificació genètica de les cèl·lules musculars per tal de produir insulina i incrementar la captació de glucosa circulant podia revertir el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica en alimentació, i fins i tot, disminuir els nivells de glucosa en sang fins a uns valors completament normoglicèmics.

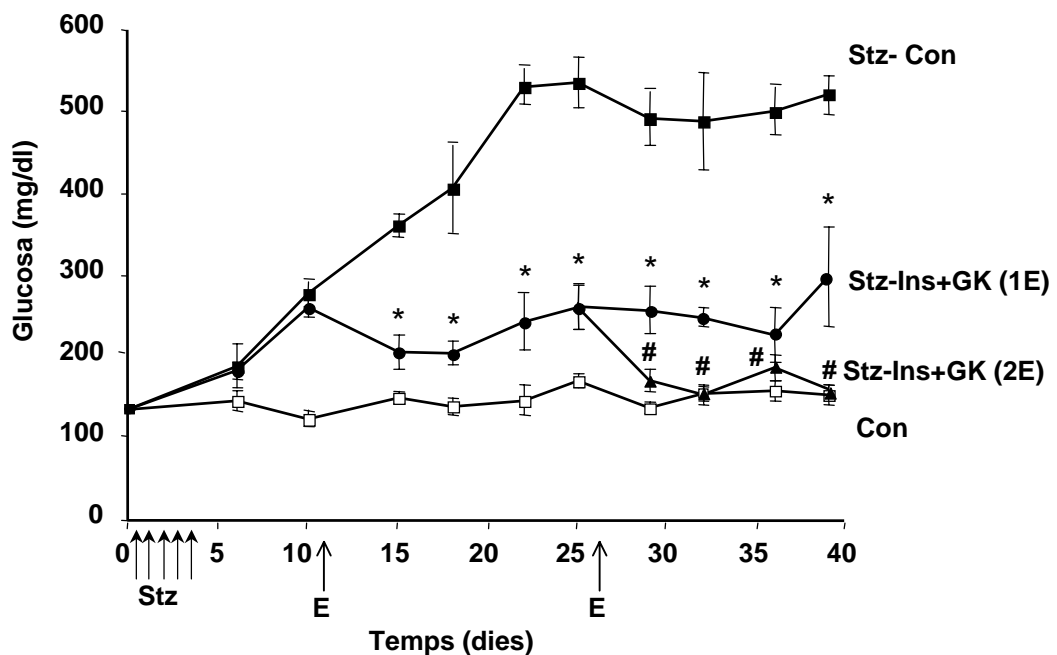


Figura 18. Glucèmia en alimentació dels animals electrotransferits amb els gens CMV/hIns i CMV/GK. El resultat són la mitjana \pm SEM de 10 animals per grup. * $p < 0.05$ vs Stz-Con & Con. # $p < 0.05$ vs Stz-Con. E, electrotransferència.

Paral·lelament, es va estudiar si l'expressió d'insulina i de glucoquinasa en els animals electrotransferits podia revertir el desenvolupament de la hiperglucèmia en dejú. Per aquest motiu es va analitzar la glucèmia 35 dies després del tractament amb Stz i posteriorment a un dejuni de 12 hores. Com es pot observar en la Figura 19, els ratolins control tractats amb Stz presentaven una clara hiperglucèmia en dejú, mentre que la glucèmia observada en els ratolins electrotransferits amb els plàsmids codificants per a la insulina i per a la glucoquinasa era similar a la glucèmia observada en els ratolins control sans. Tanmateix, es va observar que el grup de ratolins que havien estat electrotransferits dues vegades amb els plàsmids codificants per a la insulina i per a la glucoquinasa presentaven una glucèmia normalitzada, amb uns nivells similars als dels ratolins control sans.

Aquests resultats suggerien que la modificació genètica de les cèl·lules musculars per tal de produir insulina i incrementar la captació de glucosa no produïa l'aparició d'hipoglucèmia durant un període de dejú.

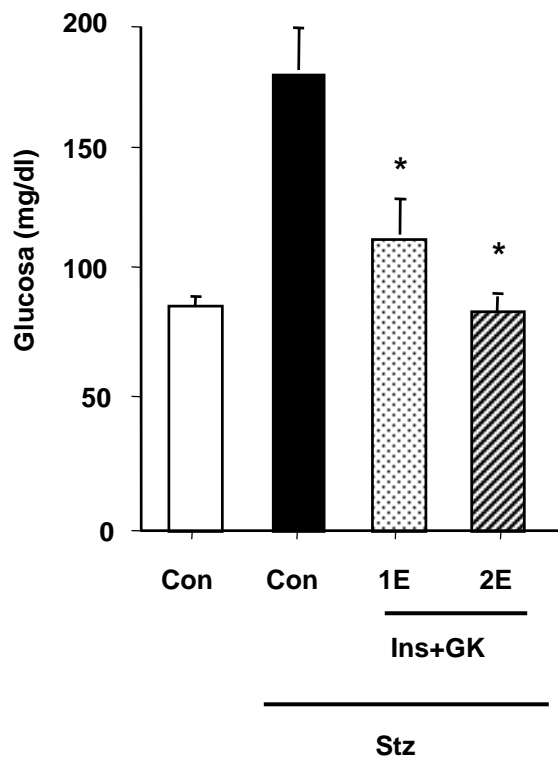


Figura 19. Glucèmia en dejú dels animals electrotransferits amb els gens de la insulina i de la glucoquinasa. El resultats són la mitjana \pm SEM de 10 animals per grup. (*) $p < 0.05$ vs Stz-Con. E, electrotransferència.

2.2.2. Estudi de la insulinèmia en els animals tractats amb Stz.

Posteriorment, es va estudiar si la producció d'insulina per part dels músculs dels ratolins diabètics permetia recuperar els nivells d'insulina en sang. Així doncs, es va analitzar la concentració d'insulina a partir de mostres de sèrum procedents de ratolins control normals, i ratolins tractats amb Stz i electrotransferits amb els gens de la insulina i de la glucoquinasa.

L'anàlisi de la insulinèmia es va realitzar mitjançant RIA per determinar els nivells totals d'insulina circulant (humana + ratolí), i mitjançant ELISA per determinar els nivells circulants d'insulina de ratolí.

Els nivells totals d'insulina circulant en els ratolins control tractats amb Stz eren inferiors als nivells observats en els ratolins control sans (Figura 20). En canvi, els ratolins electrotransferits una o dues vegades amb els plàsmids codificants per la insulina i per a la glucoquinsasa, tot i presentar una insulinèmia entre un 30 i 20 % inferior a l'observada en els ratolins control sans, aquestes eren entre 2 i 3 vegades superiors a la dels ratolins control diabètics (Figura 20). Al mateix temps, en determinar els nivells d'insulina de ratolí, es va observar que tots els ratolins tractats amb Stz mostraven una reducció entre el 65 i 70% respecte els nivells observats en els ratolins control sans (Figura 20).

Aquests resultats ens van suggerir que la diferència dels valors d'insulina circulant observada entre la insulina total i la insulina de ratolí, molt probablement, corresponia a la insulina humana produïda pel múscul esquelètic.

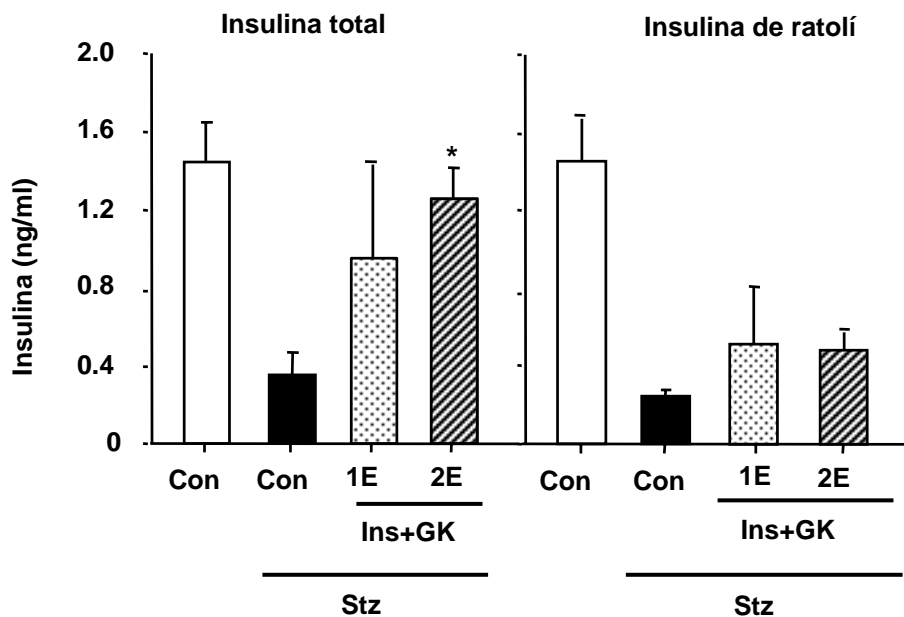


Figura 20. Nivells d'insulina en sang en els ratolins electrotransferits amb els plàsmids CMV/hIns i CMV/GK. Les determinacions d'insulina total i insulina de ratolí es van realitzar per radioimmunoassaig i Elisa respectivament, tal i com s'indica en els *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 10 ratolins per grup. (*) $p < 0,05$ vs Stz-Con.

2.2.3. Estudi d'altres paràmetres sèrics en els animals tractats amb Stz.

Donat que els animals electrotransferits amb la insulina i la glucoquinasa presentaven normalització de la glucèmia i un increment en la insulinèmia, es van determinar també els nivells circulants d'àcids greixosos i triglicèrids. Els ratolins control tractats amb Stz van presentar una concentració d'àcids greixosos lliures 2 vegades superior a la dels ratolins control normals. En canvi els ratolins diabètics que expressaven insulina i glucoquinasa en el múscul presentaven uns nivells més similars als observats en els ratolins control sans (Taula 3). De la mateixa manera, els ratolins electrotransferits amb els gens de la insulina i de la glucoquinasa van presentar una disminució dels nivells de triglicèrids respecte als observats en els ratolins control diabètics, els quals assolien uns nivells similars als dels ratolins control sans (Taula 3).

Aquests resultats suggerien que, a l'igual que havíem observat en els ratolins Tg Ins+GK, la producció d'insulina per part dels músculs electrotransferits permetia

restablir el metabolisme general de l'animal, la qual cosa evitava l'aparició d'alteracions en els nivells sèrics de triglicèrids i àcids greixosos associats al desenvolupament de la diabetis (Taula 3).

Taula 3. Determinació dels àcids greixosos lliures i triglicèrids circulants.

	NEFAS (mM)	Triglicèrids (mg/dl)
Controls	0,8 ±0,04	122±20
Stz-Controls	1,7± 0,03	215±26
Stz- Ins+GK (2E)	1,3±0,04	144±16

Es va determinar la concentració d'àcids greixosos lliures i de triglicèrids en el sèrum dels ratolins control sense tractar, dels ratolins control diabètics Stz-Con i Stz-Ins+GK com s'indica en els *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitjana ± SEM de 10 animals per grup.

2.2.4. Test de tolerància a la glucosa.

Es va realitzar un test de tolerància a la glucosa dues setmanes després d'haver realitzat el tractament amb Stz als ratolins control, als ratolins una vegada electrotransferits amb la insulina i la glucoquinasa i als ratolins sans. Així doncs, prèviament a l'inici del test es van dejunar els animals durant 16 hores. Abans d'administrar el bolus de glucosa ja hi havien diferències significatives en els nivells de glucosa en sang. Els ratolins controls tractats amb Stz presentaven una clara hiperglucèmia en dejú (Figura 21) En canvi, els ratolins diabètics electrotransferits amb la insulina i la glucoquinasa presentaven una glucèmia similar a l'observada en els ratolins control sans (Figura 21). Després de l'administració de la glucosa, la glucèmia dels animals va incrementar en tots els grups. No obstant, l'augment de la glucèmia va ser major en el grup dels ratolins control diabètics, mantenint durant tot el test uns nivells de glucosa molt superiors als observats en els ratolins control sans i electrotransferits amb insulina i GK. En canvi, els ratolins electrotransferits amb els

gens de la insulina i de la glucoquinasa van recuperar la seva glucèmia basal després d'administrar la sobrecàrrega de glucosa. D'aquesta manera, quinze minuts després de l'administració del sucre, la glucèmia dels ratolins diabètics electrotransferits amb la insulina i la glucoquinasa era similar a la dels ratolins control sans (Figura 21). A més a més, aquest grup de ratolins varen presentar una glucèmia equivalent a l'observada en els ratolins control normals durant tot el test (Figura 21). Aquests resultats suggerien que l'expressió d'insulina i de glucoquinasa per part del múscul esquelètic, apart d'incrementar la captació de glucosa per aquest teixit, també contribuïa a millorar l'estat general dels ratolins.

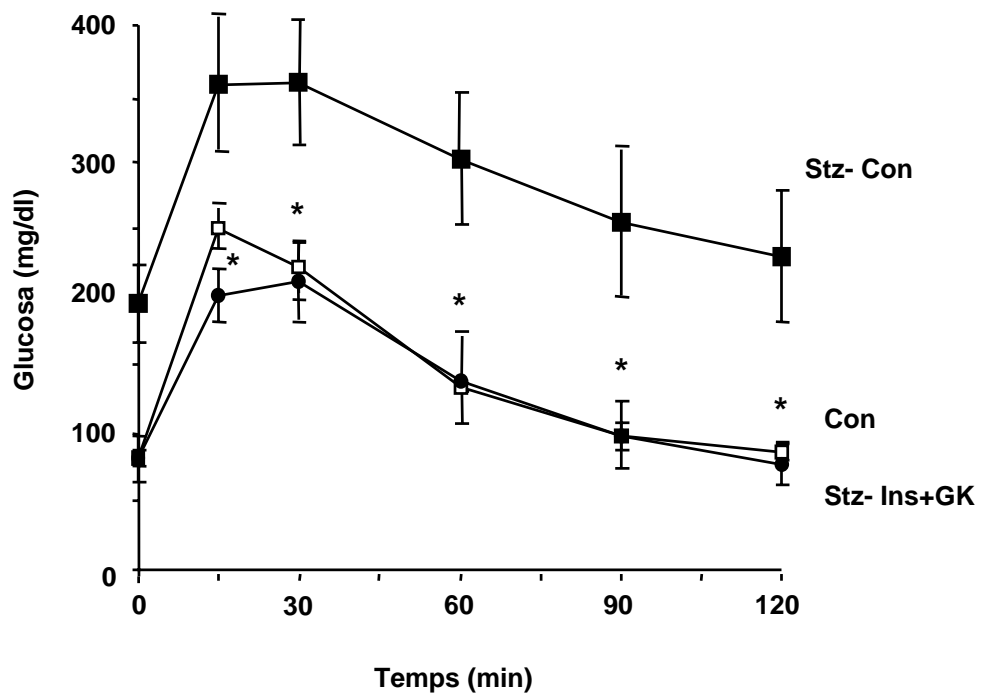


Figura 21. Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa. Ratolins control, insulina i glucoquinasa diabètics, i ratolins control normals dejunats van ser sotmesos a un test de tolerància a la glucosa. Aquest es va realitzar mitjançant una injecció intraperitoneal del sucre (1 mg/g de pes viu) a temps 0. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 6 ratolins per grup. (*) $p < 0.05$ vs Stz-Con.

2.2.5. Efecte de l'expressió de la insulina i de la glucoquinasa sobre el metabolisme de la glucosa en el múscul esquelètic d'animals tractats amb Stz.

Donat que els animals diabètics que expressaven insulina i glucoquinasa en el múscul esquelètic presentaven una reducció de la hiperglucèmia, es va estudiar quin era el seu

efecte sobre el metabolisme de la cèl·lula muscular. Amb aquesta finalitat es va determinar: (1) l'expressió de gens claus implicats en el metabolisme de la glucosa, (2) l'índex de captació de glucosa, i (3) com era afectada la massa muscular.

2.2.5.1. Efecte de l'expressió de la insulina i de la glucoquinasa sobre l'expressió de gens claus del metabolisme muscular.

En sacrificar els animals 40 dies després del tractament amb Stz, es va analitzar l'expressió d'insulina i de glucoquinasa a múscul esquelètic dels ratolins que varen ser electrotransferits amb els dos gens. Per aquest motiu, es va obtenir el RNA total de tots els músculs esquelètics manipulats. Es va analitzar l'expressió d'insulina i de glucoquinasa en els ratolins control i en els ratolins diabètics 30 dies després de la primera electrotransferència, i 15 dies després de la segona. Únicament es va observar la presència de transgens d'insulina i de glucoquinasa en els músculs dels animals que havien estat electrotransferits. No obstant, es va advertir que l'expressió dels gens de la insulina i de la GK en els ratolins una vegada electrotransferits era molt inferior a l'observat en els animals que van ser electrotransferits dues vegades. Aquests resultats suggerien que la menor expressió d'insulina i de glucoquinasa apreciada en els ratolins una vegada electrotransferits es devia, molt probablement, a la pèrdua de DNA plasmídic en els músculs d'aquests animals.

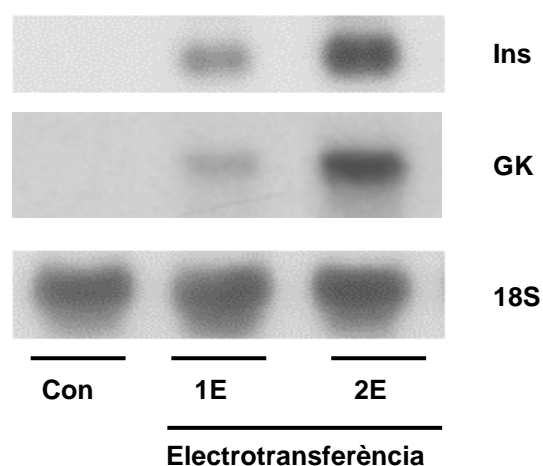


Figura 22. Expressió de la insulina i de la glucoquinasa en el múscul esquelètic. Es va determinar el nivell d'expressió de la insulina i de la glucoquinasa en els ratolins electrotransferits amb els plàsmids CMV/hIns i CMV/GK 30 i 15 dies després de

l'electrotransferència. Els nivells d'expressió es van determinar a partir del RNA total dels músculs esquelètics *tibialis anterior*, *quadriceps* i *gastrocnemius* de ratolins control tractats amb Stz i electrotransferits una o dues vegades amb els plàsmids codificants per a la insulina i per a la glucoquinasa. Es presenta un *Northern blot* representatiu hibridat amb les sondes de cDNA específiques per a la insulina i per a la glucoquinasa.

Posteriorment, es va analitzar quin era l'efecte de la insulina produïda sobre l'expressió de gens claus implicats en la captació i fosforilació de la glucosa per part del múscul esquelètic. El transportador de glucosa GLUT-4 i la hexoquinasa II (HKII) són les principals isoformes de proteïnes implicades en el transport i la fosforilació de glucosa en teixits sensibles a la insulina, l'expressió dels quals es regulable per l'hormona. Els nivells d'expressió del transportador de glucosa, així com de la HKII, havien disminuït en els ratolins control tractats amb Stz. En canvi, els nivells d'expressió de la HKII i el GLUT-4 observats en els músculs dels ratolins diabètics que expressaven els gens de la insulina i de la glucoquinasa eren similars als dels ratolins control normals. Aquests resultats suggerien que l'expressió d'insulina per part del múscul esquelètic afavoria el restabliment dels nivells d'expressió dels gens implicats en el transport i la fosforilació de la glucosa.

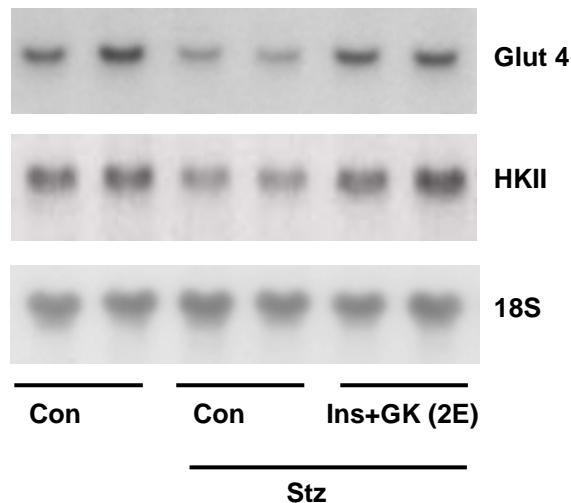


Figura 23. Expressió de Glut 4 i HKII en els músculs electrotransferits amb els gens de la insulina i de la glucoquinasa. Es va determinar, mitjançant l'anàlisi per *Northern blot* del RNA total del múscul l'expressió de gens clau en la captació i en la utilització de glucosa en el múscul de ratolins diabètics control i electrotransferits amb els plàsmids codificants per a la insulina i per a la glucoquinasa, i de ratolins control normals. Es presenta un *Northern blot* representatiu hibridat amb les sondes de cDNA específiques per GLUT 4 i HKII.

2.2.5.2. Efecte de l'expressió de la insulina i de la glucoquinasa sobre l'índex de captació de glucosa del múscul esquelètic.

La reducció de la glucèmia observada en els animals electrotransferits indicava, d'una banda, que l'efecte de la insulina restablint l'expressió del GLUT 4 i HKII conjuntament amb l'expressió de la GK, portava, molt probablement, a un increment en la captació de glucosa. Així doncs, es va determinar l'índex de captació de glucosa en els músculs que havien estat electrotransferits amb els plàsmids CMV/hIns i CMV/GK a partir de la incorporació de glucosa radioactiva en el múscul esquelètic. Per aquest motiu, es va induir diabetis experimental a ratolins control i se'ls va electrotransferir amb els gens de la insulina i de la glucoquinasa. Al cap de 5 dies de l'electrotransferència de DNA, els animals que expressaven insulina i glucoquinasa en el múscul esquelètic van presentar una reducció de la seva glucèmia (de 424 ± 27 mg/dl a 223 ± 66 mg/dl), mentre que els ratolins control continuaven clarament hiperglucèmics (de 432 ± 36 mg/dl a 435 ± 39 mg/dl) (Figura 24).

En determinar la captació de glucosa en el múscul esquelètic, es va observar que la captació en els músculs dels ratolins diabètics electrotransferits amb els gens de la insulina i de la glucoquinasa era, aproximadament, 3 vegades superior a la observada en els ratolins diabètics control (Figura 24). Aquests resultats demostraven que l'expressió d'insulina i de glucoquinasa en el múscul esquelètic incrementava la captació de glucosa per part d'aquest teixit, el qual recuperava la capacitat d'eliminar glucosa de la sang i reduïa així la hiperglucèmia diabètica.

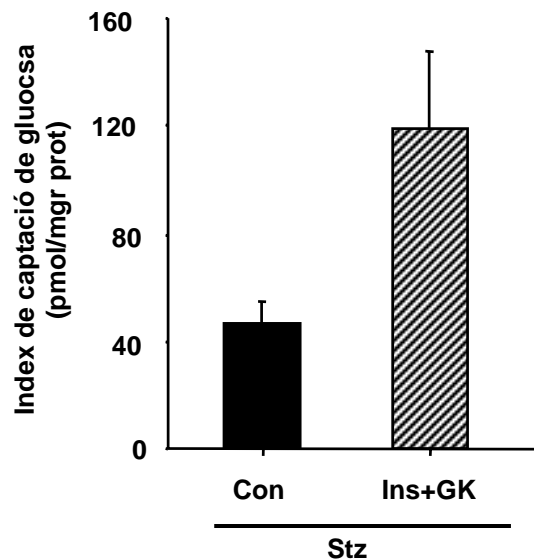


Figura 24. Índex d'utilització de la glucosa. Es va determinar l'índex de captació de glucosa a partir de glucosa marcada radioactivament tal i com s'indica en els *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 6 músculs per grup.

2.2.5.3. L'efecte de l'expressió de la insulina i de la glucoquinasa sobre la massa muscular modificada genèticament.

En diabetis, la disminució progressiva d'insulina, dona lloc a un increment de la proteòlisi muscular per tal de subministrar precursors gluconeogènics per al fetge. Això porta a una reducció gradual de la massa muscular. Per aquest motiu, es va estudiar si l'expressió d'insulina i de glucoquinasa en el múscul esquelètic podia revertir la pèrdua de massa muscular associada a l'estat diabètic. Per tal d'analitzar la pèrdua de massa muscular es va determinar el pes dels músculs *tibialis anterior*, *gastrocnemius* i *quadriceps* a l'inici i al final de l'experiment. Al cap de 7 setmanes de la inducció de diabetis, els ratolins control tractats amb Stz havien perdut un 3% de la seva massa muscular (de 0.75 ± 0.05 g a 0.732 ± 0.03 g), mentre que els animals diabètics electrotransferits amb insulina i glucoquinasa i els ratolins control sans l'havien incrementat. Tanmateix, el major increment (al voltant del 36%) va ser observat en els ratolins control sans (de 0.75 ± 0.05 g a 1.02 ± 0.03 g), mentre que els ratolins diabètics que havien estat una o dues vegades electrotransferits amb la insulina i la glucoquinasa havien incrementat la seva massa muscular al voltant d'un 20% (de 0.75 ± 0.05 g a 0.89 ± 0.05 g) i un 30% (de 0.75 ± 0.05 g a 0.97 ± 0.02 g), respectivament.

2.2.6. L'efecte de l'expressió de la insulina i de la glucoquinasa per part del múscul esquelètic sobre el metabolisme hepàtic en animals tractats amb Stz.

La reducció dels nivells d'insulina com a resultat del desenvolupament de diabetis dona lloc a un increment de la producció hepàtica de glucosa i a una disminució en la captació del sucre per part dels hepatòcits. Els enzims PEPCCK i GK, regulats per la insulina, són enzims claus en la regulació del flux de les vies metabòliques implicades en la producció i en la captació de la glucosa en el fetge. En absència d'insulina, l'expressió de la PEPCCK es troba incrementada, mentre que l'expressió de la GK resta

disminuïda. Amb la finalitat d'estudiar si la insulina produïda pel múscul en els ratolins electrotransferits tenia algun efecte sobre el metabolisme de la glucosa a fetge, es van analitzar els nivells d'expressió de la PEPCK i la GK en els ratolins diabètics electrotransferits amb insulina i glucoquinasa.

A causa de la disminució de la insulinèmia, l'expressió de la PEPCK en els ratolins controls tractats amb Stz estava molt incrementada. En canvi, els ratolins diabètics electrotransferits amb els gens de la insulina i de la glucoquinasa presentaven uns nivells d'expressió de la PEPCK similars als nivells observats en els ratolins control sans (Figura 25). Per altra banda, l'absència d'insulina produïa que en els ratolins diabètics l'expressió de la GK es trobés molt disminuïda. En canvi, els ratolins electrotransferits amb els gens de la insulina i de la glucoquinasa van presentar un increment en els nivells d'expressió de la GK superiors als observats en els ratolins control diabètics (Figura 25).

Aquest resultats suggerien que la insulina produïda en el múscul esquelètic actuava en el fetge incrementant la captació i la utilització de glucosa per part d'aquest teixit, alhora que inhibia la producció hepàtica de glucosa.

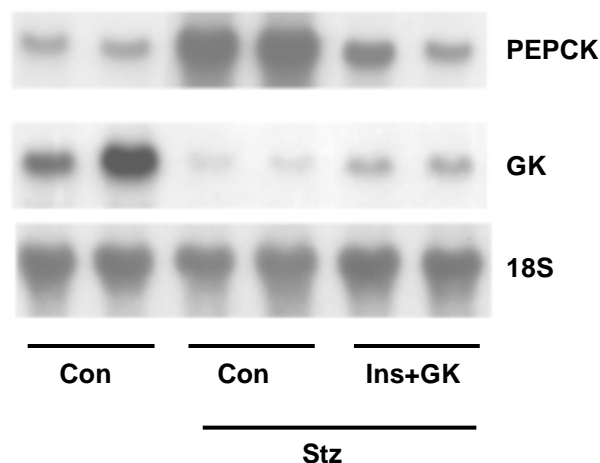


Figura 25. Expressió de PEPCK i GK en el fetge. Es va determinar mitjançant l'anàlisi per *Northern blot* de RNA total de fetge l'expressió de gens clau en la captació i en la utilització hepàtica de glucosa en els ratolins diabètics control i electrotransferits amb insulina i glucoquinasa i en els ratolins control normals. Es presenta un *Northern blot* representatiu hibridat amb les sondes de cDNA específiques per a PEPCK i per a GK.

2.2.7. Evolució de l'increment del consum d'aigua, de menjar i de pes corporal.

Un increment en el consum d'aigua (polidipsia) i de menjar (polifàgia), així com la pèrdua de pes corporal són tres dels símptomes clínics més característics associats al desenvolupament de l'estat diabètic. Per aquest motiu, es va analitzar l'evolució d'aquests símptomes en els ratolins control tractats amb Stz electrotransferits amb insulina i glucoquinasa en relació als ratolins control diabètics.

Els ratolins control tractats amb Stz van desenvolupar una clara polidipsia i polifàgia. Al cap de 20 dies després de la inducció de diabetis, el consum d'aigua ja havia incrementat aproximadament 4 vegades respecte al consum d'un ratolí control sense tractar (Figura 26). Paral·lelament a l'increment del consum d'aigua, el consum de menjar en aquest grup de ratolins havia augmentat 2 vegades respecte al consum d'un ratolí control normal (Figura 26). En canvi, 20 dies després de la inducció de diabetis amb Stz, els ratolins que expressaven insulina i glucoquinasa en el múscul esquelètic varen presentar un consum d'aigua i de menjar pràcticament normal (Figura 26). No obstant, els ratolins electrotransferits una sola vegada varen presentar una tendència a incrementar gradualment, tant el consum d'aigua com de menjar, mentre que el consum d'aigua i de menjar en els ratolins electrotransferits per segona vegada estava pràcticament normalitzada (Figura 26).

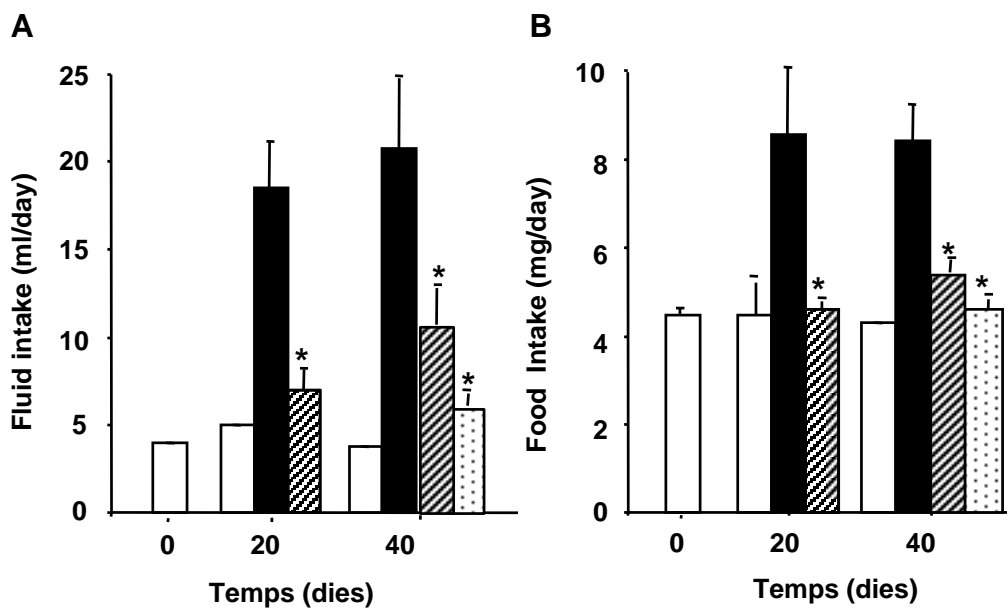


Figura 26. Evolució del consum d'aigua (A) i de menjar (B) en els ratolins control diabètics electrotransferits amb els plàsmids insulina i glucoquinasa i en els ratolins control normals. El consum d'aigua i de menjar es va determinar en animals individualitzats tal i com s'indica en els *Materials i Mètodes*. Els resultats són la mitja \pm SEM de 10 animals per grup. (*) $p < 0.05$. vs Stz-Con. Con \square , Stz-Con \blacksquare , Stz-Ins+GK (1E) \boxtimes , Stz-Ins+GK (2E) \boxplus

El desenvolupament de l'estat diabètic va associat a un important trastorn en el metabolisme general de l'individu, el qual dona lloc a una severa alteració del seu pes corporal. Amb la finalitat d'estudiar si una millora de l'estat diabètic mitjançant la producció d'insulina i l'increment de la captació de glucosa per part del múscul podia evitar l'aparició d'alteracions en el pes corporal del ratolins diabètics, es va analitzar l'increment del pes en els diferents grups d'animals durant el temps en què es va realitzar l'experiment.

Tots els grups van incrementar el seu pes corporal, no obstant, els ratolins control normals van mostrar un increment del 28% (de $25 \pm 0,27$ g a $32,5 \pm 0,78$ g), essent el grup que va presentar l'augment més important. D'altra banda, els ratolins tractats amb Stz van presentar un menor augment del seu pes corporal. En aquest cas, els ratolins control d'aquest grup van presentar, amb tan sols un 6%, (de $25 \pm 0,27$ g a $26,1 \pm 0,86$ g) un menor augment del seu pes corporal. En canvi, els ratolins electrotransferits una o dues vegades amb els plàsmids codificants per a la insulina i per a la glucoquinasa, van incrementar el seu pes corporal entre un 12 i 13 % (de $25 \pm 0,27$ g a $28,2 \pm 0,54$ g; de $25 \pm 0,27$ g a $28,4 \pm 0,48$ g).

La diabetis de tipus 1 es produeix com a conseqüència de la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β dels illots de Langerhans, la qual cosa dona lloc a l'absència d'insulina. La teràpia substitutòria amb insulina és el tractament més estès per a corregir la manca de l'hormona i evitar així el desenvolupament de la hiperglucèmia i les complicacions secundàries associades. No obstant, aquesta teràpia no és perfecta ja que no s'assoleixen els nivells fisiològics d'insulina adequats per mantenir una correcta homeostasi de la glucosa. A més, els règims substitutoris actuals estan associats a un elevat risc d'aparició d'episodis hipoglucèmics.

Per aquest motiu, actualment s'estan dissenyant noves teràpies per al tractament de la diabetis de tipus 1. Entre les diferents estratègies existents, s'està investigant molt activament la manipulació de cèl·lules extrapancreàtiques; bé per produir una font endògena d'insulina madura, bé per incrementar la captació de glucosa per part d'aquests teixits, el que condueix a una disminució de la hiperglucèmia diabètica. En aquest sentit, en el nostre laboratori hem estudiat aquestes dues aproximacions mitjançant la manipulació genètica del múscul esquelètic; ja sigui per tal que expressi insulina o glucoquinasa. En ambdós casos s'ha observat que l'expressió individual d'aquests gens permet contrarestar parcialment la hiperglucèmia diabètica (Otaegui, 2000; Riu, 2002).

Per tal d'obtenir una millor contrarestració de l'estat diabètic, en aquest treball hem estudiat si l'expressió conjunta de la insulina i de la glucoquinasa per part del múscul esquelètic permet superar les limitacions observades en la reducció de la hiperglucèmia quan aquests gens són expressats individualment.

Amb la finalitat d'estudiar aquesta nova aproximació es van obtenir ratolins doble transgènics (Tg Ins+GK) mitjançant l'encreuament de les dues línies de major expressió dels transgens dels ratolins Tg Ins i Tg GK. En aquest estudi hem observat que aquests animals han incorporat en el seu genoma el gen quimèric de la insulina i el de la GK i que expressen tant insulina madura com GK en múscul esquelètic. A més a més, la coexpressió d'aquests dos gens ofereix una millor resposta davant de canvis bruscs en la concentració de glucosa circulant quan aquests són sotmesos a un test de tolerància al sucre. Aquest fet coincideix amb altres treballs on s'incrementa l'expressió de gens claus implicats en el transport de la glucosa com GLUT 4 (Treadway, 1994; Ren, 1995;

Liu, 1993), o de la fosforilació de la glucosa, com la GK (Otaegui, 2000). En aquests estudis s'ha observat que la sobreexpressió de GLUT 4 o l'expressió de GK a múscul millora la resposta per tal de normalitzar la glucèmia davant canvis bruscs en la concentració de glucosa en sang.

Així doncs, els estudis realitzats en els ratolins Tg Ins+GK sans indiquen que l'expressió d'insulina i GK per part del múscul esquelètic ofereix una millor resposta a una sobrecàrrega de glucosa. Per aquest motiu, en aquest treball també hem estudiat si durant la diabetis, l'expressió d'insulina i de glucoquinasa incrementa la capacitat del múscul esquelètic per eliminar la glucosa circulant, i reduir així la hiperglucèmia. Així doncs, després de la inducció de diabetis amb Stz, els ratolins control presenten una marcada hiperglucèmia a mesura que es desenvolupa l'estat diabètic. En canvi, els ratolins doble transgènics Ins+GK presenten una pràctica normalització de la glucèmia en alimentació, així com normoglucèmia en dejú. La reducció de la hiperglucèmia observada en aquests animals ens indica que la coexpressió d'insulina i de GK incrementa la capacitat de captació i d'eliminació de glucosa per part del múscul. Prèviament, els estudis realitzats en els ratolins Tg Ins han mostrat que la fosforilació de la glucosa és la principal limitació per a la reducció de la hiperglucèmia (Riu, 2002). La baixa Km de la HKII (10-100 μ M), així com la seva inhibició per la glucosa-6-P, són els principals factors que disminueixen la capacitat del múscul de normalitzar la glucèmia en aquests animals (Wilson, 1984; Printz, 1993b; Iynedjian, 1993). En canvi, en els ratolins doble transgènics, l'expressió de GK permet superar aquesta limitació ja que aquest enzim presenta una elevada Km per la glucosa i no és inhibit per la glucosa-6P. D'altra banda, els estudis realitzats en els ratolins Tg GK mostren que el transport de la glucosa cap a l'interior de la cèl·lula muscular és la principal limitació per a la completa reducció de la hiperglucèmia (Otaegui, 2000). L'absència d'insulina en aquests animals dona lloc a una disminució dels nivells de GLUT4 i del transport de glucosa insulino-dependent, el que redueix el flux d'entrada de glucosa cap a l'interior de la cèl·lula muscular (Burcelin, 1993; Napoli, 1995 i Kahn, 1992). En canvi, en els ratolins doble transgènics, l'expressió d'insulina per part del múscul evita la reducció del transport de glucosa cap a l'interior cel·lular ja que permet mantenir el contingut de GLUT 4 a la membrana. Així doncs, la coexpressió d'insulina i glucoquinasa en el múscul compensa les limitacions observades en els Tg Ins i Tg GK. Per tant, la coexpressió dels dos gens converteix aquest teixit en una "bomba" d'eliminació de

glucosa, on la major o menor captació de sucre vindrà determinada per l'activitat glucoquinasa en relació als nivells de glucosa en sang. Això elimina la necessitat de produir insulina de manera regulada, essent únicament necessària una producció basal de l'hormona per mantenir actiu el transport de glucosa cap a l'interior cel·lular. Aquest fet és més evident quan, en realitzar un test de tolerància a la glucosa, aquests animals són capaços de contrarestar l'augment de la glucèmia i d'assolir altra vegada els seus nivells basals al final del test.

El desenvolupament d'hipoglucèmia és actualment el factor limitant per mantenir un estricte control de la glucèmia en pacients diabètics de tipus 1 tractats amb teràpia substitutòria amb insulina (DCCT, 1993). La hipoglucèmia nocturna és particularment perillosa ja que el pacient no és conscient de la seva situació i sovint no es desperta, la qual cosa pot produir conseqüències fatals. Per això, s'ha estudiat si la producció d'uns nivells basals d'insulina per part del múscul, juntament amb un increment de la captació de glucosa per part d'aquest teixit, pot provocar l'aparició d'episodis hipoglucèmics. En aquest sentit, després d'un dejuni de 24 hores, els ratolins Tg Ins+GK no desenvolupen hipoglucèmia i presenten sempre uns nivells de glucosa circulant similars als observats en els ratolins control sans. El no desenvolupament d'hipoglucèmia ve determinat pel fet que la captació de glucosa per part del múscul va disminuint a mesura que avança el dejuni i, per tant, disminueix la glucèmia. Això coincideix amb els resultats obtinguts prèviament en miotubs C₂C₁₂GK. Aquests miotubs expressen l'enzim GK i s'ha observat que la captació de glucosa per part de la GK depèn de les concentracions extracel·lulars del sucre (Otaegui, 2002). Igualment, aquests resultats també són observats en cèl·lules d'hepatoma i en cèl·lules musculars humanes que expressen GK (Valera, 1994a; Baqué, 1998), així com en hepatòcits de ratolins transgènics que sobreexpressen l'enzim GK (Ferre, 1996a). Per tant, la glucosa proporciona una regulació a curt termini de l'activitat GK i, en últim terme, de la captació de glucosa a través de la cooperativitat existent entre la GK i la glucosa. A més a més, els resultats en els animals doble transgènics ens indiquen que la producció basal d'insulina per part del múscul està dins d'un rang fisiològic que permet mantenir la normoglucèmia, alhora que evita l'aparició d'episodis d'hipoglucèmia.

En la diabetis de tipus 1, l'absència d'insulina comporta una reducció del transport insulino-dependent i la utilització de glucosa en el múscul esquelètic (Postic, 1994;

Prinzl, 1993). No obstant, el tractament amb insulina normalitza el metabolisme de la glucosa en aquest teixit. Així, en aquest treball, també hem analitzat si la insulina produïda pel múscul esquelètic actua sobre la pròpia cèl·lula muscular restaurant el metabolisme de la glucosa. S'ha observat que el contingut del transportador de glucosa GLUT 4 en les membranes es manté normal en els ratolins Tg Ins+GK, mentre que aquest és molt menor en els ratolins control diabètics. Aquests resultats indiquen que la insulina produïda per part del múscul esquelètic té un efecte autocrí/paracrí sobre la pròpia cèl·lula muscular que incrementa el transport de la glucosa cap a l'interior cel·lular. Així, es supera la primera limitació observada en la captació i la utilització de glucosa per part del múscul en diabetis. Per tant, també s'ha analitzat si l'expressió de glucoquinasa en el múscul permet recuperar la capacitat de fosforilació de la glucosa del múscul esquelètic i restaurar completament el metabolisme de la glucosa en aquest teixit. En aquest cas, s'ha observat que l'expressió de GK en els ratolins Tg Ins+GK permet normalitzar les concentracions de glucogen i glucosa-6P musculars. Això ens indica, que l'expressió conjunta d'insulina i de GK normalitza el transport i la fosforilació de glucosa de les cèl·lules musculars en condicions diabètiques. Així, la captació i la utilització de la glucosa en el múscul es veu incrementada per l'expressió de insulina i glucoquinasa, el que contribueix a reduir la hiperglucèmia. Un paper clau en el transport i la fosforilació de la glucosa en la regulació del metabolisme de la glucosa a múscul s'observa també en els ratolins transgènics que sobreexpressen GLUT 4 (Burcelin, 1993; Lombardi, 1997) o glucoquinasa en aquest teixit (Otaegui, 2000). No obstant, en cap d'aquests models transgènics s'ha observat una normalització de l'estat diabètic.

Experiments previs han mostrat que la insulina produïda per teixits extrapancreàtics pot sortir a la circulació i tenir un efecte endocrí sobre la resta del organisme (Mitanchez,1998; Muzzin, 1997; Falqui, 1999; Riu, 2002;). En aquest estudi també hem observat que la insulina produïda pel múscul esquelètic és alliberada al torrent sanguini i manté uns nivells sèrics pràcticament normalitzats. Això ens indica que, tot i que el múscul esquelètic és un dels teixits perifèrics que expressa un major nombre de receptors de l'hormona (Lamothe,1998; White, 1994), aquest és capaç de produir suficient quantitat d'insulina per què pugui sortir a la circulació i compensar així la disminució associada al desenvolupament de diabetis.

També hem observar que la insulina produïda en els ratolins doble transgènics és biològicament activa, ja que afecta altres teixits, com el fetge i el teixit adipós. En diabetis, l'absència d'insulina dóna lloc a una inhibició de la captació i de la utilització de la glucosa per part del fetge i a un increment de la producció hepàtica del sucre (Pilkis,1992). Aquest fet es tradueix en una disminució de la via gluconeogènica i un augment del flux metabòlic de la via glucolítica. La GK i la PEPCK són enzims reguladors claus d'aquestes vies metabòliques, l'expressió dels quals és regulada per la insulina (Iynedian, 1993; Hall, 2000). Així doncs, s'ha observat que l'expressió de la GK es troba incrementada en els ratolins Tg Ins+GK, mentre que l'expressió de la PEPCK és menor. Aquests resultats ens indiquen que la insulina produïda pel múscul dels ratolins Tg Ins+GK està actuant sobre el metabolisme hepàtic de la glucosa. Per una banda, l'estimulació de l'expressió de la GK està incrementant la captació i la utilització del sucre en el fetge, mentre que la inhibició de l'expressió de la PEPCK redueix, al mateix temps, la producció hepàtica de glucosa. Així doncs, l'acció de la insulina produïda pel múscul sobre el metabolisme hepàtic de la glucosa contribueix, igualment, a la normalització de la glucèmia en aquests animals. De manera similar, ratolins transgènics que sobreexpressen gens claus implicats en la regulació de les vies metabòliques relacionades amb la captació i la utilització de glucosa per part del fetge presenten el metabolisme hepàtic de la glucosa normalitzat (Ferre, 1996a, Morral, 2002).

Paral·lelament a l'acció de la insulina sobre el metabolisme hepàtic de la glucosa, aquesta també contribueix a normalitzar els diferents paràmetres sèrics que es troben alterats en la diabetis. L'absència d'insulina produeix un augment de la lipòlisi en el teixit adipós, el que incrementa els nivells circulants d'àcids greixosos lliures. D'igual forma, la captació de triglicèrids per part del teixit adipós disminueix, el que contribueix d'aquesta manera a incrementar els seus nivells sèrics. D'altra banda, els àcids greixosos lliures són oxidats en el fetge per produir cossos cetònics, els quals s'alliberen a la sang i donen lloc a la cetoacidèmia (Miles, 1980). En aquest sentit, els ratolins Tg Ins+GK presenten uns nivells normalitzats d'àcids greixosos lliures, així com de triglicèrids i cossos cetònics. Tot aquests resultats ens indiquen que la insulina produïda és biològicament activa i que està actuant sobre el teixit adipós i el fetge, el que dóna lloc a la restauració del metabolisme lipídic en aquests teixits. Això, permet

contrarestar les alteracions dels paràmetres sèrics associades al desenvolupament de diabetis.

El desenvolupament d'hiperglucèmia està associada a l'aparició dels principals símptomes clínics de la diabetis. Aquests es caracteritzen per un increment en el consum d'aigua (polidípsia) i de menjar (polifàgia), així com un augment de l'excreció d'orina (poliúria). En aquest treball hem estudiat si la correcció de la hiperglucèmia observada en els animals doble transgènics també prevé l'aparició d'aquests símptomes. En aquest sentit, el consum d'aigua i de menjar en els ratolins doble transgènics és similar al consum observat en un ratolí sa, mentre que els ratolins diabètics presenten una marcada polidípsia i polifàgia. Per altra banda, s'ha observat que el nivell d'excreció d'orina en els ratolins doble transgènics és molt menor que l'observat en els ratolins diabètics control, ja que l'interval de temps requerit en canviar les gàbies dels animals és superior. Així doncs, aquests resultats ens indiquen que l'expressió d'insulina i glucoquinasa per part del múscul esquelètic, a més a més de contrarestar el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica, prevé l'aparició dels principals símptomes clínics associats a la malaltia. Al mateix temps, aquests resultats ens suggereixen que, mitjançant l'expressió d'insulina i de glucoquinasa, podem assolir un correcte control de la glucèmia.

Així doncs, els resultats obtinguts mitjançant la utilització de ratolins doble transgènics demostren que l'expressió d'insulina i glucoquinasa per part del múscul esquelètic pot esdevenir una nova aproximació de teràpia gènica per al tractament de la diabetis mellitus de tipus 1. Per aquest motiu, en aquest estudi també hem analitzat si la transferència dels gens de la insulina i la GK en el múscul esquelètic *in vivo* durant el procés diabètic pot revertir el desenvolupament de la malaltia.

Entre els diferents vectors existents per a transferir gens a múscul esquelètic, l'electrotransferència de DNA plasmídic en solució és actualment la tècnica que ofereix una major eficiència de transfecció, així com un major nivell d'expressió en aquest teixit. A més a més, l'electrotransferència ofereix la possibilitat de transferir el DNA a múscul produint un mínim dany tissular. El dany muscular, així com la infiltració limfocitària associada, poden induir una resposta inflamatòria contra el plàsmid

injectat i, per tant, reduir el nivell i el temps d'expressió del gen. Per aquest motiu, l'establiment d'unes condicions adequades d'electrotransferència permetran preservar les fibres transfectades de la destrucció i, a la vegada, assolir uns nivells i un temps d'expressió majors. Durant els últims anys, s'han descrit molts protocols d'electrotransferència associats, tots ells, a un major guany d'eficiència de transfecció i de nivell d'expressió en relació a un mínim dany tissular. Per aquest motiu, prèviament a la transferència dels gens de la insulina i la glucoquinasa al múscul esquelètic dels ratolins diabètics, hem estudiat quina de les condicions descrites recentment és la que ens permet transferir el DNA de forma més eficient. Per altra banda, la utilització d'unes condicions d'electrotransferència que ens permetin obtenir uns nivells elevats d'expressió ens faciliten, al mateix temps, poder regular més acuradament la dosi gènica d'insulina i glucoquinasa a administrar.

En aquest treball hem comparat dues condicions diferents d'electrotransferència, de les quals una d'elles permet transfectar aproximadament el 80% de les fibres del múscul electrotransferit. A més a més, en aquestes condicions s'obté un elevat nivell d'expressió als 5 dies de la realització de l'electrotransferència. Les condicions utilitzades en aquest estudi requereixen la realització d'un pretractament del múscul esquelètic amb l'enzim hialuronidasa (McMahon, 2001). Aquest enzim degrada l'àcid hialurònic del teixit conjuntiu que envolta les fibres musculars i permet que el DNA injectat pugui accedir a una major àrea muscular. Igualment, el tractament amb hialuronidasa permet reduir el voltatge del camp elèctric a aplicar i eliminar, d'aquesta manera, el dany tissular produït per l'administració del camp elèctric. Així doncs, el petit dany tissular observat en aplicar aquestes condicions d'electrotransferència es deu, principalment, al procediment d'injecció més que a l'aplicació del camp elèctric, dany que desapareix dues setmanes després de la realització del tractament. També hem estudiat si la inducció de diabetis mitjançant el tractament amb Stz pot afectar l'eficiència de l'electrotransferència de DNA a múscul. La conclusió ha estat que el tractament amb Stz no modifica l'eficiència de l'electrotransferència i que es produeix la mateixa quantitat de proteïna que en els ratolins sans als 5 dies de l'electrotransferència de DNA.

Una vegada establertes les condicions d'electrotransferència hem analitzat si l'aproximació estudiada mitjançant la utilització de ratolins transgènics pot ser aplicable mitjançant teràpia gènica a ratolins diabètics. El múscul esquelètic constitueix, aproximadament, el 40 % de la massa corporal. A diferència dels ratolins transgènics, en els quals totes les fibres musculars expressen els gens de la insulina i la GK, en els ratolins electrotransferits només s'expressen tals gens en els músculs *tibialis anterior*, *quadriceps* i *gastrocnemius*. Així doncs, en aquest estudi mostrem que la transferència dels gens de la insulina i la GK a, aproximadament, un 8% de la massa muscular, és suficient per a contrarestar, o fins i tot revertir, el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica tant en alimentació com en dejuni.

L'assoliment de la normoglicèmia en els ratolins diabètics electrotransferits amb els gens de la insulina i GK depèn de la "dosi de gen" administrada. Així, els ratolins diabètics dues vegades electrotransferits assoleixen una glucèmia similar a la dels ratolins control sans, mentre que els ratolins només una vegada electrotransferits presenten una glucèmia lleugerament superior. Tot i així, en aquest últim cas els nivells de glucosa en sang són similars als obtinguts amb el tractament substitutori amb insulina actual (Pickup, 1997). Igualment, s'ha observat que la glucèmia dels animals només una vegada electrotransferits incrementa gradualment al llarg del temps, el que relaciona aquest increment de la glucèmia en aquests animals amb una disminució en el nivell d'expressió dels dos gens. Aquests resultats ens suggereixen que, per tal d'assolir la normoglicèmia, es requereix superar un llindar mínim d'expressió de la insulina i la GK, així com la readministració de DNA per tal que l'expressió dels dos gens sigui sempre superior a aquest mínim requerit i poder mantenir la normoglicèmia de manera perllongada. De la mateixa manera, la disminució de l'expressió dels dos gens pot deure's a diverses causes; com ara la progressiva pèrdua del DNA plasmídic de les cèl·lules electrotransferides o bé a la inactivació del promotor del CMV.

La reducció de la hiperglucèmia està associada a un increment de la captació de glucosa per part de les fibres musculars que han estat electrotransferides. Per això, en determinar l'índex de captació de glucosa dels músculs electrotransferits amb els gens de la insulina i la glucoquinasa, s'ha observat que la capacitat d'incorporació de

glucosa marcada radioactivament és, aproximadament, 3 vegades superior a l'observada en els músculs d'un ratolí diabètic control. Això, al mateix temps, està relacionat amb el fet que l'expressió d'insulina per part d'aquestes cèl·lules indueix una major sensibilització de la maquinaria implicada en el transport i en la fosforilació de glucosa. Així doncs, els nivells d'expressió del transportador de glucosa GLUT 4 i de la hexoquinasa II en els músculs electrotransferits és superior als nivells observats en els músculs d'un ratolí diabètic control. Alhora, l'augment de la captació de glucosa permet millorar la resposta d'aquests animals davant canvis sobtats en la concentració de glucosa circulant en realitzar un test de tolerància a la glucosa. Així doncs, després de l'administració del sucre, els ratolins electrotransferits amb els gens de la insulina i la glucoquinasa presenten al llarg del test una glucèmia similar a l'observada en els ratolins control sans. Aquests resultats suggereixen que la modificació d'aquest 8% de la massa muscular és suficient per establir un bon control de la glucèmia i poder restablir la normoglicèmia davant canvis sobtats en els nivells de glucosa circulants. Per altra banda, la restauració del metabolisme muscular evita la degradació d'aquest teixit per tal de subministrar precursors gluconeogènics, el que permet mantenir la massa muscular en els animals que han estat modificats.

En aquest treball també s'observa que la modificació genètica de la massa muscular amb els gens de la insulina i la glucoquinasa és suficient per a produir prou quantitat d'insulina per què aquesta arribi a la sang i eviti així la hipoinsulinèmia associada al desenvolupament de diabetis. A més a més, la insulina produïda és biològicament activa i té un efecte endocrí sobre altres teixits com el fetge. Per tant, la insulina produïda té un efecte sobre el metabolisme hepàtic de la glucosa, la qual cosa augmenta l'expressió de l'enzim GK en el fetge, així com la captació de glucosa per part d'aquest teixit, fet que també contribueix a disminuir l'hiperglicèmia diabètica.

L'increment de la captació i la utilització de glucosa per part del múscul, així com la producció d'insulina en els ratolins electrotransferits, permet millorar l'estat general dels ratolins diabètics. D'aquesta manera, els animals electrotransferits amb els gens de la insulina i la GK no desenvolupen cap dels símptomes clínics associats a la malaltia (polidípsia i polifàgia) i presenten una menor alteració en el seu pes corporal. A més a més, els animals electrotransferits mostren una pràctica normalització de les concentracions sèriques de triglicèrids i àcids greixosos lliures, els quals estan

normalment alterats com a conseqüència del desenvolupament de la diabetis. Aquests resultats suggereixen que, tal i com hem observat en els ratolins doble transgènics, la insulina produïda pels músculs electrotransferits actua sobre el fetge i el teixit adipós, la qual cosa restaura el metabolisme lipídic d'aquests animals.

D'aquesta manera, els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que la manipulació genètica del múscul esquelètic per què produeixi insulina i incrementi la captació de glucosa podria utilitzar-se com a tractament alternatiu a la teràpia substitutòria o al trasplantament de pàncrees o illots en pacients amb diabetis de tipus 1. Així, l'expressió conjunta d'insulina i de glucoquinasa en el múscul esquelètic conduiria a una normalització de la hiperglucèmia diabètica així com del metabolisme general. Això es deuria, d'una banda, a un increment de la captació i de la utilització de la glucosa per part del múscul esquelètic i, per l'altra, a un efecte endocrí de la insulina produïda sobre el fetge i el teixit adipós (Figura 1). A més, la naturalesa del múscul esquelètic i la seva fàcil accessibilitat fa que teràpies centrades en la manipulació genètica d'aquest teixit siguin molt atractives per a la seva aplicació posterior en pacients humans. La naturalesa postmitòtica i la longevitat de les fibres musculars assegura, alhora, un major temps d'expressió dels gens transferits i elimina la necessitat d'administrar dosis repetides en breus intervals de temps. Així doncs, durant els últims anys s'han desenvolupat nous vectors virals i no virals els quals podrien, en un futur pròxim, fer accessible l'aplicació d'aquesta aproximació en pacients humans com a un nou tractament alternatiu a les teràpies substitutòries actuals. No obstant, abans que teràpies d'aquest tipus puguin ser aplicables a pacients diabètics cal realitzar molts més assaigs en altres models animals de diabetis més autoimmune.

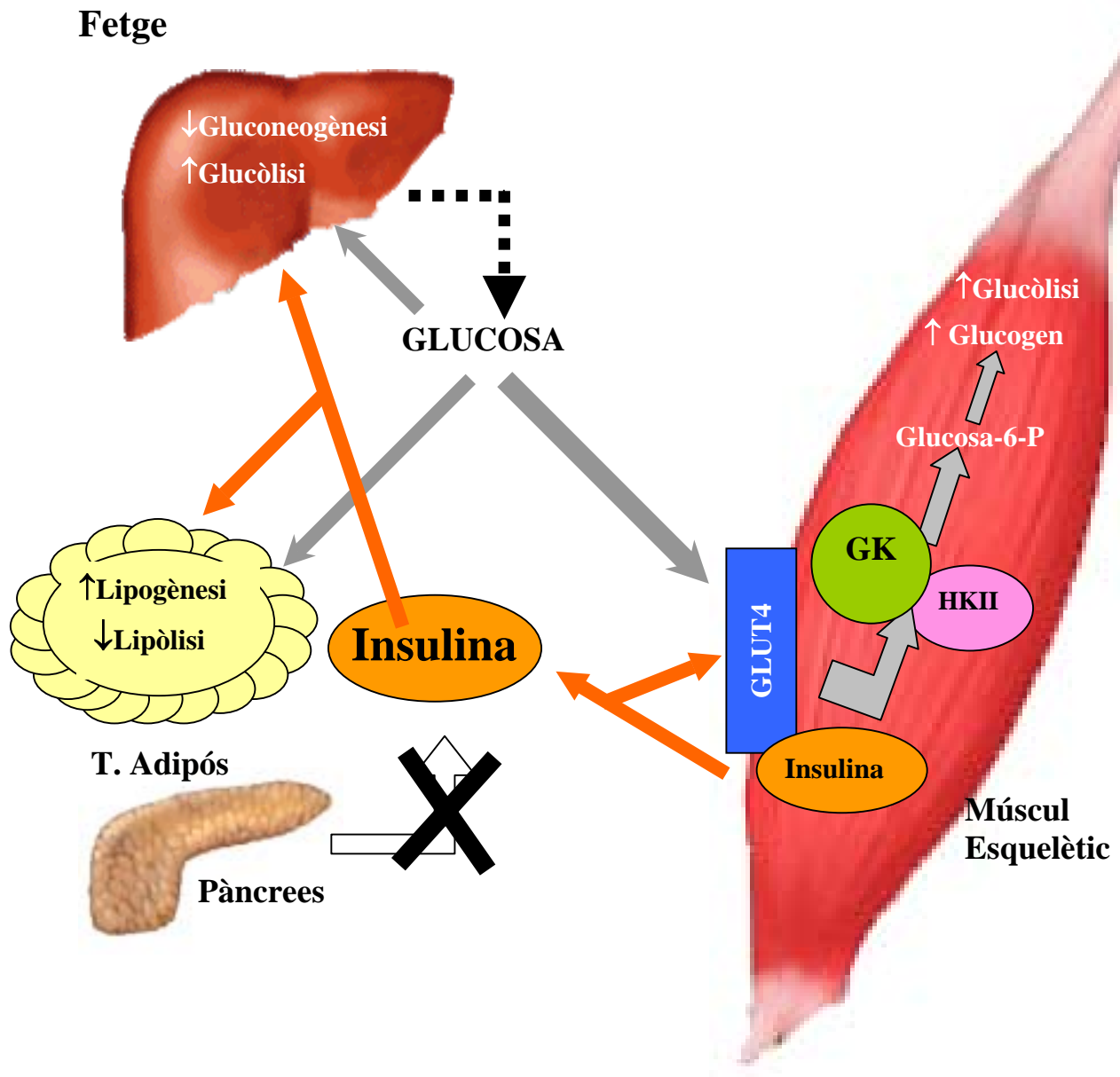


Figura 1. Esquema representatiu de l'efecte de la coexpressió d'insulina i de la glucoquinasa en el múscul esquelètic amb l'objectiu de revertir el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica.

1. S'han obtingut ratolins doble transgènics que han incorporat en el seu genoma i expressen alhora els gens de la insulina i la glucoquinasa sota el control del promotor de la cadena lleugera de la miosina. Aquests animals són viables i tenen una vida reproductiva normal.
2. La coexpressió del gen de la insulina i la glucoquinasa en ratolins doble transgènics reverteix el desenvolupament de la hiperglucèmia diabètica. Aquests animals assoleixen unes concentracions sèriques de glucosa pràcticament normals en alimentació, així com la normoglucèmia i l'absència d'episodis hipoglucèmics en dejú.
3. La producció constitutiva d'insulina per part del múscul en aquests animals permet corregir la disminució de la insulinèmia associada a la destrucció de les cèl·lules β .
4. Després de tres mesos de tractament amb Stz, els ratolins doble transgènics mostren un test de tolerància a la glucosa millorat, el que indica que aquests animals responen correctament enfront d'una sobrecàrrega de glucosa.
5. L'expressió d'insulina i glucoquinasa per part del múscul esquelètic produeix un augment del metabolisme de la glucosa; això manté els nivells de GLUT 4 a la membrana i incrementa la fosforilació de la glucosa i la concentració de glucogen muscular.
6. La insulina produïda pel múscul té un efecte endocrí sobre la resta de teixits perifèrics. A nivell hepàtic, s'observa un increment de la captació i de la utilització de la glucosa i una disminució de la producció del sucre, el que contribueix a la normalització dels paràmetres sèrics.
7. La reducció de la hiperglucèmia diabètica per l'expressió d'insulina i de GK en el múscul dona lloc a una millora de l'estat general dels animals i evita el desenvolupament de polidípsia i polifàgia.
8. L'electrotransferència de DNA a múscul esquelètic amb un tractament previ amb hiauronidasa permet transfectar una elevada àrea muscular i obtenir uns alts

nivells d'expressió amb un mínim dany tissular. A més a més, l'eficiència de transfecció no s'altera per la inducció de diabetis amb Stz.

- 9.** L'electrotransferència dels músculs *tibialis anterior*, *quàdriceps* i *gastrocnemius* amb els gens de la insulina i la glucoquinasa permet revertir completament el desenvolupament de la hiperglucèmia i la hipoinsulinèmia diabètica.
- 10.** Els músculs electrotransferits amb els gens de la insulina i la glucoquinasa presenten un augment del metabolisme de la glucosa, donant lloc a un increment de la captació i de la utilització del sucre.
- 11.** Els ratolins diabètics electrotransferits amb els gens de la insulina i la glucoquinasa mostren un augment del metabolisme hepàtic de la glucosa, contribuint així a la pràctica normalització dels paràmetres sèrics.
- 12.** L'electrotransferència de la insulina i la glucoquinasa en els ratolins diabètics produeix una millora de l'estat general de l'animal, evitant l'aparició de polidípsia i polifàgia, així com una major recuperació del pes corporal.
- 13.** Tots aquests resultats suggereixen que la manipulació del múscul esquelètic per què expressi insulina i glucoquinasa pot esdevenir un tractament alternatiu a les teràpies actuals per al tractament de la diabetis de tipus 1.

MATERIALS.

1. ANIMALS.

Els animals utilitzats en aquest estudi es van obtenir a partir de l'encreuament de colònies de ratolins prèviament establertes i caracteritzades en el nostre laboratori. Concretament, els ratolins doble transgènics s'obtingueren a partir de l'encreuament dels ratolins transgènics que expressaven el cDNA de la insulina mutada i de la glucoquinasa a múscul esquelètic sota el promotor de la cadena lleugera de la miosina (MLC) (Riu 2002; Otaegui, 2000). La tècnica utilitzada per a l'obtenció dels ratolins transgènics MLC/hIns i MLC/GK va ser la de microinjecció de DNA en el pronucli masculí d'òvuls fecundats. En aquesta tècnica es van utilitzar com a femelles donadores d'embrions ratolins híbrids B6SJL, procedents de l'encreuament de les soques C57BL/6 i SJL (IFFA CREDO) i els animals de la soca CD1 (Charles River) com a femelles receptores (Hogan, 1986; Yun y Wagner, 1989). En els experiments de teràpia gènica es van utilitzar ratolins C57BL/6 x SJL de 8 setmanes d'edat procedents del Servei d'Estabulari de la UAB.

Tots els animals es trobaven en condicions de temperatura i llum controlada (12 hores de llum i 12 hores de foscor) i eren alimentats amb una dieta estàndard de laboratori (Panlab MR, Barcelona). 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.

2. 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 medi LB, que contenia 50 mg/ml d'Ampicilina o 50 mg/ml de Kanamicina, segons el gen de resistència del plàsmid per a la seva selecció. Es van conservar a -80°C en medi LB que contenia un 20% (vol/vol) de glicerol.

Els vectors plasmídics emprats en aquest treball han estat els següents: pMLC/hIns, pMLC/GK, pTG6600-hIns, pTG6600-GK, pEGFP-C1, pCMV-Bgal, pBS-18ScDNA y el pBS-PEPCK.

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), Quiagen 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 -³²P] dCTP s'adquireixen a Amersham Biosciences. L'estreptozotocina utilitzada per induir diabetis experimental es va adquirir a Sigma.

4. SONDES.

La sonda GK corresponia al fragment EcoRI-EcoRI de 2.3Kb del cDNA de la GK (cedit pel Dr.P.Iynedjian, Universitat de Gènova, Gènova, 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 d'insulina corresponia al fragment de 0.4Kb EcoRI-EcoRI del cDNA del gen (cedit per el Dr. W.Rutter). La sonda GLUT4 corresponia al fragment de 2.4Kb EcoRI-EcoRI del cDNA. La sonda de HKII corresponia al fragment de 2.3 Kb EcoRI-EcoRI del gen. La sonda 18S corresponia al fragment de 5.7 Kb EcoRI-EcoRI del cDNA del rRNA humà (cedit pel Dr. Gamboa).

5. ANTICOSSOS.

Els anticossos utilitzats en aquest treball varen ser:

- anticòs de conill contra la proteïna de membrana GLUT-4 (cedit pel Dr. Zorzano).
- anticòs de conill contra la proteïna β -gal comprat a ABCAM (ref. 616)
- anticòs secundari de cabra- contra IgG de conill biotinitat – PIERCE, Illinois, USA.
- anticòs secundari de cabra contra IgG de conill, conjugat amb Biotina – Santa Cruz Biotechnology, ING.
- anticòs terciari streptavidina conjugat amb FITC – Invitrogen corp. Carlsbad, CA, EEUU.
- anticòs terciari conjugat amb el complex ABC – PIERCE, Illinois, EEUU.

MÈTODES.

1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE DNA.

1.1. Preparació de DNA plasmídic.

Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic es realitzen minipreparacions de DNA segons el protocol de lisi alcalina descrit originalment per *Birnboim i Doli* (1979). El plàsmid 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 en una degradació de la paret bacteriana per l'acció de la lisozima seguida per una lisi alcalina de l'esferoplast i una precipitació selectiva del DNA genòmic bacterià i de les proteïnes desnaturalitzades per l'acció d'una solució concentrada d'acetat potàssic a pH àcid. Després, el DNA plasmídic és purificat mitjançant extraccions amb fenol-cloroform i posteriorment precipitat amb isopropanol. El RNA bacterià és degradat mitjançant RNAasa A.

Les solucions emprades són:

Solució de lisozima (preparació extemporània)

Tris-HCl pH 8.0	25mM.
EDTA	10 mM.
Glucosa	50 mM.
Lisozima	5 mg/ml.
RNAasa	100 mg/l

Solució de llisi:

NaOH	0.2 M.
SDS	1%.

Solució d'acetat potàssic pH 4'8

Acetat potàssic	3 M.
Àcid acètic glacial	2 M.

L'obtenció de grans quantitats de DNA es realitza mitjançant maxipreparacions de DNA, a partir de 250-500ml de medi de cultiu. El mètode es basa, igualment, en una lisi alcalina però la purificació del DNA es realitza pel mètode de lisi alcalina amb posterior purificació del DNA plasmídic amb columnes de Qiagen^{MR}.

El DNA plasmídic lliure d'endotoxines s'obté a partir de 1-1.5 litres de medi de cultiu i es purifica pel mètode de lisi alcalina seguint el protocol de MEGAPREP de la casa Qiagen^{MR}. Aquest protocol està dissenyat per a la preparació de fins a 2.5 mg de DNA plasmídic lliure d'endotoxines, el qual millora l'eficiència de transfecció en cèl·lules eucariotes.

1.2. Restricció enzimàtica de DNA.

Les endoculeases de restricció, enzims purificats a partir de bacteries o fongs, presenten una elevada especificitat respecte a seqüències curtes de DNA i actuen sobre elles trencant els enllaços fosfodièsters, i per tant, la cadena 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.

1.3. Resolució i purificació de fragments de DNA.

1.3.1. Gels d'agarosa.

L'electroforesi en gels d'agarosa és una tècnica útil per a la separació analítica o preparativa de fragments de DNA de mida superior a 100 pb. La visualització dels fragments de DNA s'aconsegueix mitjançant la incorporació al gel del colorant fluorescent Bromur d'Etidi (0.5µg/ml), que s'intercala entre les dues cadenes de DNA i que provoca una banda ataronjada quan aquestes són il·luminades amb llum ultravioleta 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 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.

Tampó d'electroforesi (TAE 1X)

Tris-acetat pH 8.3	40 mM
EDTA	1 mM

Tampó de càrrega 10X

Glicerol	50 % (vol/vol)
EDTA	100 mM
SDS	1% (p/vol)
Blau de Bromofenol	0.1 % (p/vol)

1.3.2. Purificació dels fragments de DNA per gene-clean.

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 un agent caotrópic, en aquest cas 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 seguint les instruccions del subministrador.

1.4. Construcció de molècules híbrides de DNA.

Amb l'objectiu de 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 DH5α 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.

1.4.1. Subclonatge.

Les tècniques de subclonatge (digestió del DNA amb enzims de restricció, lligacions dels diferents fragments de DNA, etc.) són àmpliament utilitzades amb diferents finalitats. En aquest treball s'utilitzen per a la construcció dels gens quimèrics pTG6600/hIns i pTG6600/GK.

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

Les cèl·lules DH5α d' *E. Coli* utilitzades es fan competents mitjançant l'ús de MgCl₂ i CaCl₂ com a agents permeabilitzadors de membrana. El mètode de transformació utilitzat és l'anomenat *Heat Shock* o Xoc Tèrmic, mitjançant el qual s'incuben les cèl·lules competents amb el DNA plasmídic en qüestió 10 minuts en gel; posteriorment s'incuben 45 segons a 42 °C i es deixen 5 minuts en gel. S'afegeixen 200 µl de LB i s'incuben 40 minuts a 37 °C en agitació. Finalment es plaquegen amb el medi selectiu

adequat, en el nostre cas LB + 50 µg/ml d'ampicil·lina o bé LB + 50 µg/ml de kanamicina.

LB (Luria-Bertrani Broth)

Triptona	10 g/l
Extracte de llevadura	5 g/l
NaCl	5 g/l

2. OBTENCIÓ I ANÀlisi D'ANIMALS DOBLE TRANSGÈNICS.

2.1. Obtenció de DNA genòmic.

Diferents mètodes han estat desenvolupats per preparar DNA genòmic de qualitat per a l'anàlisi d'animals transgènics. Molts dels mètodes incorporen extraccions amb fenol, extensius pipeteigs i transferència de mostres. El mètode descrit aquí minimitza els passos per a produir DNA genòmic d'alt pes molecular amb una qualitat suficient per realitzar digestions enzimàtiques i, posteriorment, l'anàlisi per Southern Blot. Aquest mètode no utilitza dissolvents orgànics però sí que fa servir tampons saturats de sal per a precipitar la major part de les proteïnes de la mostra.

S'addiciona 495 µl de tampó de lisi al tub que conté el tros de cua de ratolí i sacsegem amb el Vortex. A continuació afegim 5 µl de Proteinasa K (a una concentració stock de 10 mg/ml) i incubem la solució 14h a 56°C. Entre 6-12 hores pot ser suficient si les mostres són breument sacsejades dues o tres vegades. Posteriorment afegim 250 µl de NaCl saturat i barregem durant 5 minuts per tal d'homogeneïtzar les mostres. Tot seguit, centrifuguem a velocitat màxima durant 10 minuts i transferim el sobrenedant a un nou tub eppendorf etiquetat, el qual conté 500 µl d'isopropanol. Mitjançant inversió precipitem el DNA i el peletgem per centrifugació a temperatura ambient, a velocitat màxima, durant 5 minuts i eliminem el sobrenedant per aspiració. Finalment rentem amb EtOH al 70% (opcionalment per duplicat) i resuspenem el pellet en 60 µl de solució tampó TE pH 7.5 (o alternativament amb H₂O estèril).

Les mostres es guarden a 4°C fins a fer-lo servir.

Tampó de lisis

Tris-HCL pH 8.5	100 mM.
EDTA pH 8	5 mM.
SDS	0.2%(p/vol).
NaCl	200 mM.

Proteinasa K

10mg/ml. Guardar al congelador a -20°C.

TE

Tris- HCl pH 8	10 mM.
EDTA pH 8	1 mM.
H2O esteril.	
Ajustar a pH=7.5	

NaCL saturat:

Addicionar NaCl a una solució de 5M NaCl, mentre barregem, fins que la sal no es dissolgui més en la solució i precipiti al fons de la ampolla. Guardar a temperatura ambient.

2.2. Detecció dels animals per Southern Blot.

Una vegada obtingut el DNA genòmic a partir del tros de cua de ratolí, la incorporació dels transgens dins del genoma es detecta per una anàlisi de Southern blot. Amb aquest objectiu, es digereixen 10 µg de DNA mitjançant l'ús d'enzims de restricció de manera que almenys un dels talls de restricció realitzats per l'enzim es produeix dins de la seqüència del transgèn (*Hind III* per Insulina i *EcoRI* per GK). Posteriorment, els productes de la digestió són separats mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa (1% agarosa/TAE 1x) i transferits sobre una membrana de nylon.

Prèviament a la transferència a la membrana, el gel és tractat per tal d'aconseguir una eficient transferència. Aquest tractament consisteix en: 15 minuts en una solució HCl 0,25 N per aconseguir la despurinització i assegurar la transferència en el filtre de les bandes d'elevat pes molecular; 20 minuts en solució alcalina (1.5 M NaCl, 0,5 M

NaOH) per tal de desnaturalitzar el DNA i facilitar-ne també la transferència; i un mínim de 20 minuts en una solució neutralitzant (1M tris, 3M NaCl) que permet neutralitzar el pH i carregar negativament el DNA de nou.

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).

Un cop el DNA és fixat a la membrana es procedeix a la realització de la prehibridació, durant unes 2 hores a 65°C. La solució de prehibridació conté principalment proteïnes, detergents com el SDS i ssDNA per tal que s'hibridin i bloquegin la membrana, reduint així la hibridació inespecífica. Posteriorment, es realitza la hibridació amb la sonda de DNA, homòloga a la seqüència present en el transgèn, marcada radioactivament (3-5·10⁶ cpm/ml) durant tota la nit. A continuació, es renta la membrana per eliminar la sonda en excés i aquella que es mantingui per unions molt dèbils. Es realitzen 3 rentats consecutius, cada un d'una astringència superior: 2 rentats, de 10 minuts cada un, amb tampó de baixa astringència, a 50° C i un rentat de 15 minuts a 65°C amb tampó d'alta astringència. Finalment, la membrana és exposada en un film fotogràfic per tal de detectar, després de l'exposició, bandes d'una mida esperada. Els diferents carrils que tenen bandes de la mida esperada corresponen a ratolins transgènics respecte al transgèn analitzat.

20x SSC

NaCl	3 M
Citrat Sòdic	0,3 M, pH 7,4

Solució de prehibridació i hibridació

Na ₂ HPO ₄ – pH 7,2	0,25 mM
SDS	20% (p/vol)
EDTA	1 mM
Blocking reagent (Roche) (ref. 1096176)	0,5% (p/vol)

Solució de baixa estringènica: 2x SSC, 0,1% SDS.

Solució d'alta estringènica: 0,1% SSC, 0,1% SDS.

El marcatge de les sondes utilitzades en els Southern blot es realitza a partir del preparat comercial "Ready-To-Go™ DNA labelling beads (-dCTP)" (ref. 27-2940-01, Amersham Biosciences). En primer lloc es bullen 25 ng de sonda en un volum de 45 µl durant 10 minuts. Es posen 2 minuts en gel i es dissol la nostra sonda amb un complex liofilitzat de la casa comercial on hi ha una barreja d'oligonucleòtids, dATP, dGTP, dTTP i el fragment klenow de la DNA polimerasa d'*E.coli*. Un cop dissolt afegim 5 µl d'una solució rica en [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP i ho incubem a 37°C durant 30 minuts. Aquesta tècnica permet la síntesi de les sondes de DNA uniformement marcades amb una elevada radioactivitat específica (1,8x10⁹ dpm/mg). La separació dels nucleòtids no incorporats es realitza mitjançant columnes de gel filtració de Sephadex G-50.

3. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE RNA

3.1. Preparació de RNA total.

La preparació de RNA total es realitza a partir de mostres congelades en N₂ líquid. L'extracció de RNA es realitza mitjançant el mètode d'aïllament TriPure™ Isolation Reagent seguint les indicacions del fabricant. Aquest mètode permet l'aïllament de RNA total, DNA i proteïnes a partir de la mateixa mostra en un únic pas de separació. El mètode és una optimització del mètode d'aïllament de RNA desenvolupat per Chomczynski i Sacchi (1987).

3.2. 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. Els tampons d'electroforesi i càrrega, que es descriuen a continuació, són preparats en condicions lliures de contaminació amb ribonucleases per evitar la degradació enzimàtica del RNA.

Tampó electroforesis,

MOPS 0.2M
Acetat Na 50mM
EDTA 10 mM
Ajustat a pH 7 amb NaOH 10N.
Filtrat amb un filtre de 0.2 μ m

Gel Agarosa.

Agarosa 1%
MOPS 10X
H₂O Estèril
Formaldehid 37%

Tampó de càrrega.

Formamida desionitzada
MOPS/EDTA 10X
Formaldehid
H₂O Estèril
Glicerol
Blau de Bromofenol.
Homogenitzat i filtrat amb un filtre de 0.2 μ m

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

Aquesta tècnica consisteix en la hibridació d'una sonda de DNA o RNA marcada radioactivament amb RNA fraccionat en un gel desnaturalitzant d'agarosa i fixat a un filtre de nylon o nitrocel·lulosa.

La transferència de RNA a la membrana és bàsicament similar a la descrita pel cas de "Southern blot", amb la excepció que el RNA no és mai depurinitzat o desnaturalitzat amb NaOH. En el nostre cas, les transferències es realitzen utilitzant el sistema turboblotter™ (Schleicher & Schuell) seguint les instruccions dels fabricants. Posteriorment, el filtre és irradiat amb llum ultravioleta d'ona curta per crear unions covalents del RNA amb el nylon mitjançant l'ús de UV-Stratalinker model 1800 (Stratagene, La Jolla, CA).

El protocol per a la prehibridació, hibridació i rentats és el recomanat per la firma del fabricant de les membranes de nylon: Nylon Membranes, positively Charged. (Roche diagnostics GmbH, Germany)

4. 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 mantinguin les glucèmies més elevades i no recuperin els nivells basals de glucosa són considerats diabètics.

Es dejunen durant 12 hores animals dels diferents grups d'estudi i se'ls realitza un control de la glucèmia basal amb 5 µl de sang. La mesura de la glucèmia es fa amb el Glucometer Elite™. Un cop els animals s'han estabilitzat, se'ls injecta intraperitonealment una dosi de 0.5 mg o 1 mg de glucosa per gram de pes viu. A partir d'aquest moment es fan extraccions de sang seriades amb un interval de 30 min fins a les 3 hores de l'inici del test.

5. DETERMINACIÓ DEL CONSUM D'AIGUA I MENJAR.

La determinació del consum de menjar i aigua es realitza en animals prèviament individualitzats. La quantitat de menjar i aigua consumida s'obté per la sostracció de la quantitat final obtinguda respecte a la quantitat inicialment addicionada.

6. INDUCCIÓ DE DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT LA INJECCIÓ D'ESTREPTOZOTOCINA.

L'estreptozotocina és una molècula constituïda per una N-metil-N-nitrosurea unida al C-2 de la D-glucosa. És un antibiòtic que deriva del *Streptomyces achromogenes*, la principal funció del qual és la destrucció de la cèl·lula beta.

Per a la inducció de la diabetis experimental s'administra una injecció intraperitoneal durant cinc dies consecutius, a una dosi de 45 mg de Stz per quilogram de pes corporal. L'estreptozotocina es dissol en una solució de tampó citrat sòdic 10 mM amb

0.9% NaCl, pH 4,5 immediatament abans de la seva administració. La presència de diabetis es determina mesurant els nivells de glucosa en sang.

7. DETERMINACIÓ DELS PARÀMETRES SÈRICS.

Per obtenir sèrum de ratolí i determinar les concentracions sèriques d'insulina total, de triglicèrids, de cossos cetònics i d'àcids greixosos lliures, els animals són sacrificats per decapitació i immediatament se'n recull la sang i es diposita en gel. El sèrum s'obté després de deixar coagular la sang durant 30 min a 4°C i centrifugar a 10.000 rpm durant 30 minuts. Per a determinar les concentracions d'insulina de ratolí per ELISA, s'extreuen uns 30 µl de sang per la cua del ratolí i es recullen en tubs microvette®CB300Z (SARSTEDT, Germany). El sèrum s'obté després de centrifugar les sangs a 10.000 rpm durant 30 minuts mantinguts en gel. El sèrum es manté congelat (a -20°C) fins el moment de la determinació dels diferents paràmetres.

7.1. Determinació de glucosa.

Els nivells de glucosa sèrica es determina a partir de 5 µl de sang total d'animals sagnats per la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite™ de Bayer.

7.2. Determinació de triglicèrids.

Els triglicèrids sèrics es determinen seguint el mètode enzimàtic de *Wahlefeld* (1974) basat en la quantificació del cromogen PAP. Aquest s'obté a partir de tres reaccions acoblades en les que intervenen la glicerol quinasa, la glicerol 3-fosfat oxidasa i la peroxidasa. S'ha utilitzat l'assaig Peridochrom^R Triglicèrids GPO-PAP, adaptat per Roche per al COBAS BIO.

7.3. Determinació d'àcids greixosos no esterificats (NEFAS).

La determinació dels àcids greixosos no esterificats en sèrum es realitza mitjançant el mètode enzimàtic NEFA C de la firma comercial Wako Chemicals, Neus, Alemanya, adaptat a l'autoanalitzador COBAS-BIO. Aquest es basa en la quantificació d'un cromogen obtingut després de l'acoblament de tres reaccions en les que intervenen la Acil-CoA sintetasa, la Acil-CoA oxidasa i la peroxidasa.

7.4. Determinació de β -hidròxid butirat.

Els nivells sèrics de β -hidròxid butirat es determinen en l'autoanalitzador COBAS-BIO, utilitzant el mètode colorimètric del kit comercial D-3-Hydroxybutyric àcid de Roche Diagnostics, GmbH, Germany.

7.5. Determinació d'insulina.

La insulina es determina 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 intraassaig del 6%. Els nivells d'insulina de ratolí es determinen per ELISA a partir dels sèrums obtinguts dels animals. El kit que s'utilitza és el "Rat Insulin ELISA kit" fabricat per Crystal chem Inc.(Chicago, EEUU), el qual presenta una crosreactivitat del 100% amb la insulina de ratolí.

8. ESTUDI DEL METABOLISME DE LA GLUCOSA.

8.1. Determinació dels nivells totals de proteïna GLUT4 a múscul esquelètic.

8.1.1. Procediment d'obtenció de membranes totals.

El protocol per a l'obtenció de les preparacions de membranes totals a partir de diferents teixits de ratolí es basa en l'homogeneïtzació del teixit en un tampó refredat en gel que conté diferents inhibidors de proteases (aprotinina, pepstatina A, leupeptina, benzamidina i PMSF). Homogeneïtzem amb un politró 0.3-1 g de teixit en 8 ml de tampó. Utilitzem tubs tipus "COREX" (30 ml) per a homogeneïtzar el teixit, fent

servir l'aparell a 3-4 unitats de la seva escala de velocitat durant cicles de 30 segons fins que aconseguim una bona homogeneïtzació. Després de cada cicle es desenganxen de les ganivetes les restes de teixit que hi queden atrapades. Posteriorment centrifuguem els homogenats a baixa velocitat (20 minuts a 15000 xg). Descartem els precipitats i transferim els sobrenedants a un nou tub d'ultracentrifuga per tal de solubilitzar les miofibrilles muscular. Per a fer això, enrasem el sobrenedant a 8 ml amb tampó d'homogeneïtzació i afegim 2 ml de KCL 4 M, posteriorment incubem durant 30 minuts a 4°C amb un agitador orbital. A continuació centrifuguem els tubs a 200.000 xg durant 1 h i 30 minuts a 4°C. Descartem els sobrenedants i resuspenem els precipitats en tampó Hepes. La resuspensió es fa mantenint els tubs en gel. Es comença resuspenent amb una pipeta automàtica P200, tot seguit es continua amb l'ajut d'una xeringa a la qual s'ha substituït l'agulla per una punta de pipeta p200 aixafada i, finalment s'utilitza una agulla de 25 G. Finalment, aliquotem la suspensió i la conservem a - 20°C.

Solucions:

Tampó d'homogenització (pH 7.4) (Preparat abans d'utilitzar-lo i mantingut en gel)

Hepes	25 mM
Sacarosa	250 mM
EDTA	4 mM
Benzamida	25 mM
Leupeptina	1µM
Aprotinina	1 U/ml
PMSF	0,2 mM

Tampó hepes (pH 7.4)

Hepes	30 mM.
-------	--------

8.1.2. Determinació de la concentració de proteïnes.

L'anàlisi de la concentració de proteïnes es realitza mitjançant el mètode de Bradford, basat en el canvi de color del blau brillant de commassie quan es lliga a proteïnes i que canvia el màxim d'absorbància d'aquest cromòfor de 465 nm (sense proteïnes) a 595 nm (quan esta lligat).

Per tal de determinar la concentració es dilueixen les mostres de proteïnes en aigua. A continuació, preparem la recta patró directament en cubetes d'espectre d'un sol ús a partir d'una solució stock d'albumina sèrica bovina (BSA), normalment entre 0 i 20µg per cubeta. En paral·lel es dipositen en altres cubetes les mostres per valorar. Finalment afegim 200 µl del reactiu de Bradford, agitem per inversió i deixem reposar durant 5-10 minuts. Passat aquest temps, realitzem la lectura d'absorbància a 595 nm.

Solucions:

Reactiu de Bradford (BioRad Protein Assay, ref: 500-0006)

Solució de BSA dissolta en aigua a una concentració de 1 mg/ml.

8.1.3. Separació de proteïnes per electroforesi SDS-PAGE.

L'anàlisi de proteïnes es realitza mitjançant l'electroforesi en gels de poliacrilamida al 10% en presència de SDS (Laemli, 1970). Les mostres (1-5µg) són barrejades amb 1/4 volum de tampó de càrrega i escalfades a 95 °C durant 4 min. Les electroforesis es duen a terme a 45 mA quan les mostres estan en el gel compilador i a 60 mA a partir de la seva entrada en el gel separador. S'utilitzen marcadors de pes molecular pretenyit *kits for molecular weights 10.000 – 70.000 MW SDS-70* (Sigma).

Tampó d'electroforesi pH 8.3.

Tris Base	25 mM
Glicina	192mM
SDS	0,1% (pes/vol)

Tampó de càrrega 4x

Tris-HCL pH 6.8	62.5 mM
Glicerol	10% (vol/vol)
SDS	2% (pes/vol)
2-β mercaptoetanol	5% (vol/vol)
Blau de bromofenol	0.00125% (pes/vol)

8.1.4. Separació de proteïnes per electroforesi SDS-PAGE.

L'electrotransferència de les proteïnes del gel es fa sobre membranes Immobilon-P (millipore) en un aparell Transblot model 2051 (LKB) a 250 mA durant 2 h. en tampó d'electrotransferència.

La immunodetecció es fa seguint el marcatge no radioactiu del anticòs per *ECL western Blotting analysis system (Amersham)*. Es va seguir el protocol indicat per la casa comercial, utilitzant l'anticòs primari anti-Glut 4 (cedit pel Dr A. Zorzano, Universitat de Barcelona) a una dilució 1:500.

Tampó electrotransferència

Tris	25 mM
Glicina	150 mM
Metano	20% (vol/vol).

8.2 Determinació de metabòlits.

8.2.1. Determinació de glucosa-6-fosfat.

La determinació dels nivells intracel·lulars d'aquest metabòlit la va establir *Michat* l'any 1974, basant-se en la reacció de l'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa. Aquest enzim transforma la glucosa-6-fosfat en 6-fosfogluconat, alhora que redueix el NAD⁺ a NADH. Aquest compost es pot detectar per espectrofotometria.

S'homogeneïtzen fraccions, prèviament pesades, de fetge i de múscul (que eren congelades *in situ* amb pinces refredades en nitrogen líquid) en HClO₄ al 10%. Posteriorment, es centrifuguen a 29000xg durant 15 minuts a 4 °C i s'obté el sobrenedant. Aquest sobrenedant s'ajusta a pH 7 mitjançant K₂CO₃ 5M (utilitzant 1/10 vol. de sol. d'indicador universal). Les mostres es centrifuguen per eliminar el precipitat i, per últim, es determina el metabòlit en el sobrenedant a 37°C en un autoanàlitzador COBAS BIO utilitzant la mescla d'assaig que s'indica a continuació:

Mescla d'assaig (pH 7,4)

Tris-HCl	90 mM
MgCl ₂	25 mM

Segon reactiu

G6-PDH	30 U/ml
--------	---------

NAD⁺ 1,2 mM

8.2.2 Determinació de glucogen.

Aquest polisacàrid es determina mitjançant la tècnica descrita per *Kepler* i *Decker*, l'any 1984, que es basa en la utilització de l'enzim α -amiloglucosidasa. La glucosa alliberada per l'enzim es determina espectrofotomètricament en un autoanalitzador COBAS BIO utilitzant el kit comercial Gluco-quant[®], de Roche Diagnostics.

Per a l'obtenció dels extractes s'homogeneïtzen porcions de fetge i de múscul (que s'ha congelat *in situ* utilitzant pinces refredades en nitrogen líquid) en 10 vol de HClO₄ al 10%. A continuació, es centrifuga a 6000xg 5 minuts i es recull el sobrenedant, el qual s'ajusta amb HClO₄ al 10% a pH 5. De cada mostra s'agafen 100 μ l de solució d' α -amiloglucosidasa (10 U/ml de tampó acetat a pH 4,8). La incubació es portar a terme durant 2 hores a 50°C i s'atura afegint 250 μ l de HClO₄ al 10%. S'obté el sobrenedant i es determina la concentració de glucosa. La quantitat de glucogen es determina com la diferència obtinguda de mostres en duplicat, de les quals una s'havia incubat en α -amiloglucosidasa i l'altre no. Sense l'enzim es determina la concentració intracel·lular de glucosa lliure.

8.3. Determinació de l'índex de captació de glucosa a múscul esquelètic.

Per determinar l'índex de captació de glucosa *in vivo* s'injecta intravenosament a nivell de la jugular 1 μ Ci de l'anàleg no metabolitzable de la glucosa, 2-[1-H]deoxi-D-glucosa (2-DG; Amersham Pharmacia Boitech, Piscataway, NJ) a ratolins alimentats dels diferents grups a estudiar. L'eliminació de 2-DG de la circulació es determina segons el mètode de Somogyi (Somogyi M. 1945) a partir de 25 μ l de sang extreta de la cua a diferents temps (1, 10, 20 i 30 minuts) després de la injecció. Els músculs esquelètics (quàdriceps, gastrocnemius i tibialis) són extrets als 30 min després, un cop l'animal és sacrificat. L'índex de captació de glucosa es determina com a mesura de l'acumulació de compostos marcats radioactivament a múscul esquelètic (Ferré P. 1985). La quantitat de 2-DG-6-fosfat per mil·ligram de proteïna és dividit per la integral de la relació entre la concentració de 2-DG i la glucosa no marcada calculada.

9. ELECTROTRANSFERÈNCIA DE DNA A MÚSCUL ESQUELÈTIC.

Per electrotransferir el DNA plasmídic en solució al múscul esquelètic els ratolins són anestesiats mitjançant la injecció intraperitoneal de ketamina i xilacina.

En els estudis en que es comparen diferents condicions d'electrotransferència es fan servir les condicions descrites prèviament per el grup de investigació de L. Mir, 1998 i J McMahan, 2001.

Condicions utilitzades:

a) **Condicció 1 (Mir, 1998)**

Injecció intramuscular del DNA en solució i aplicació del camp elèctric (200 V/cm, 8 polsos, 2 Hz, 20 ms.)

b) **Condicció 2 (McMahon, 2001)**

Pretractament amb solució d'hialuronidasa (10U/múscul) (Sigma, H-3506), 2 hores abans de l'administració del DNA.

Injecció intramuscular del DNA en solució i aplicació del camp elèctric (175 V/cm, 10 polsos, 2 Hz, 20 ms).

En els estudis dels animals diabètics, el DNA plasmídic va ser electrotransferit 12 dies després del tractament amb STZ, quan la glicèmia dels ratolins estava al voltant de 250 mg/dl. Durant tot el procés els animals són anestesiats mitjançant la injecció intraperitoneal de ketamina i xylacina en una relació de 100:70 mg/Kg de pes corporal. Prèviament a la injecció del DNA o a la solució d'hialuronidasa, els animals són depilats amb molta cura mitjançant l'ús d'una *Gillette*. Totes les injeccions es fan amb xeringues de 0,5 ml amb una agulla de 30 G en una direcció distal-proximal dins dels

músculs *tibialis anterior*, *gastrocnemius* i *quadriceps* de ratolins prèviament anestesiats. En el cas de les condicions en que es requereix un pretractament amb l'enzim hialuronidasa, s'administren 25 µl d'una solució preparada al moment de hialuronidasa a una concentració de 0,4 U/µl dissolta en solució salina. Els diferents DNA plasmídics injectats són resuspesos en solució salina 0,9% NaCl. El camp elèctric és aplicat mitjançant un electroporador *BTX ECM 830 electroporator* (BTX, USA).

10. ANÀLISI DE LA QUANTITAT DE PROTEÏNA β-GALACTOSIDASA EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC.

La quantitat de proteïna β galactosidasa es determina a partir de la seva activitat mitjançant quimioluminiscència. Per això s'utilitza el Kit Galacto-light Plus TM (TROPIX, Bedford, MA; ref- BL300P), seguint les instruccions de la casa comercial. L'assaig luminomètric es realitza en un luminòmetre (LUMINOSCAN, Lab Biosistem). La quantitat de proteïna β-gal es determina a partir d'una recta patró de 2 a 40 ng, realitzada amb una preparació de proteïna β-gal purificada dissolta en una solució de fosfat sòdic 0.1 M i BSA 0.1% a una concentració de 1 mg/ml. (Sigma, G-5635).

11. ANÀLISI HISTOLÒGIC DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC.

Els músculs obtinguts dels animals electrotransferits són fixats en una solució tamponada de formol al 10% durant 24 – 48 hores a 4°C. A continuació, s'inclouen en parafina i s'obtenen seccions (2-3 µm), que posteriorment es desparafinen.

Per a visualitzar la proteïna GFP, els talls sense desparafinar es dipositen en un portaobjectes i es visualitzen per fluorescència FITC en un microscopi.

Per a detectar la proteïna β-gal els talls s'incuben tota la nit amb l'anticòs primari contra β gal a la dilució 1:900, i, posteriorment, amb un anticòs secundari obtingut en

cabra- anti conill biotinitat a la dilució 1:300. A continuació, s'amplifica la senyal amb TSA Fluorescents Sistems (ref. NEL701)

Per estudiar la morfologia dels músculs electrotransferits, els talls es tenyeixen amb hematoxilina, es renten, i posteriorment es tenyeixen de nou amb eosina. A continuació les mostres es deshidraten i s'aclareixen per, a continuació, muntar els portaobjectes i visualitzar-los al microscopi de camp clar.

12. CÀLCULS ESTADÍSTICS.

Els resultats s'expressen com la mitjana \pm error estàndard. La comparació dels resultats es realitza mitjançant la t de Student de dades no aparellades. Les diferències es consideren estadísticament significatives amb $*p < 0,05$.

- Abai, A. M., P. M. Hobart, et al. (1999). "Insulin delivery with plasmid DNA." *Hum Gene Ther* 10(16): 2637-49.
- Adorini, L., S. Gregori, et al. (2002). "Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models." *Trends Mol Med* 8(1): 31-8.
- Afione, S. A., C. K. Conrad, et al. (1995). "Gene therapy vectors as drug delivery systems." *Clin Pharmacokinet* 28(3): 181-9.
- American Diabetes Association. (2001). "Insulin administration." *Diabetes Care* 24(11): 1984-7.
- Anderson, W. F. (1998). "Human gene therapy." *Nature* 392(6679 Suppl): 25-30.
- Aoki, Y., D. P. Cioca, et al. (2003). "RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(1-2): 96-102.
- Bain, S. C., J. B. Prins, et al. (1992). "Insulin gene region-encoded susceptibility to type 1 diabetes is not restricted to HLA-DR4-positive individuals." *Nat Genet* 2(3): 212-5.
- Baque, S., E. Montell, et al. (1998). "Expression of glucokinase in cultured human muscle cells confers insulin-independent and glucose concentration-dependent increases in glucose disposal and storage." *Diabetes* 47(9): 1392-8.
- Bell, G. I., S. Horita, et al. (1984). "A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus." *Diabetes* 33(2): 176-83.
- Bell, G. I. and K. S. Polonsky (2001). "Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function." *Nature* 414(6865): 788-91.
- Bennett, S. T., A. M. Lucassen, 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(3): 284-92.
- Bettan, M., F. Emmanuel, et al. (2000). "High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle." *Mol Ther* 2(3): 204-10.
- Birnboim, H.C. and Doly, J (1979), "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA" *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-23.
- Blau, H. M. and M. L. Springer (1995). "Gene therapy--a novel form of drug delivery." *N Engl J Med* 333(18): 1204-7.
- Bolli, G. B., R. D. Di Marchi, et al. (1999). "Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus." *Diabetologia* 42(10): 1151-67.

- Bosch, A. Chillon, M. (2002) "Gens malaltia i medicina del futur." *Transversal (revista de cultura contemporanea)* 17: T34-38.
- Brange, J. (1997). "The new era of biotech insulin analogues." *Diabetologia* 40(Suppl 2): S48-53.
- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." *Nature* 414(6865): 813-20.
- Burcelin, R., R. L. Printz, et al. (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., J. Jensen, et al. (1996). "Overexpression of hexokinase II in transgenic mice. Evidence that increased phosphorylation augments muscle glucose uptake." *J Biol Chem* 271(25): 14834-9.
- Chatenoud, L. (2002). "Do NKT cells control autoimmunity?" *J Clin Invest* 110(6): 747-8.
- Chen, R., M. Meseck, et al. (2000). "Glucose-stimulated and self-limiting insulin production by glucose 6-phosphatase promoter driven insulin expression in hepatoma cells." *Gene Ther* 7(21): 1802-9.
- Chervonsky, A. V., Y. Wang, et al. (1997). "The role of Fas in autoimmune diabetes." *Cell* 89(1): 17-24.
- Cheung, A. T., B. Dayanandan, et al. (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(5235): 404-10.
- DeFronzo R.A. (1997) "Pathogenesis of Type 2 diabetes: metabolic & molecular implications for identifying diabetic genes" *Diabetes reviews* 5 (3): 177-269.
- DelloRusso, C., J. M. Scott, et al. (2002). "Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 12979-84.
- Dimitriadis, G. D. and J. E. Gerich (1983). "Importance of timing of preprandial subcutaneous insulin administration in the management of diabetes mellitus." *Diabetes Care* 6(4): 374-7.
- Dong, H., J. Altomonte, et al. (2002). "Basal insulin gene expression significantly improves conventional insulin therapy in type 1 diabetic rats." *Diabetes* 51(1): 130-8.
- Falqui, L., S. Martinenghi, et al. (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., A. Halkin, et al. (2000). "Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia." *Nat Med* 6(5): 568-72.
- Ferre, T., A. Pujol, et al. (1996a). "Correction of diabetic alterations by glucokinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14): 7225-30.
- Ferre, T., E. Riu, et al. (1996b). "Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver." *Faseb J* 10(10): 1213-8.
- Ferre, T., et al (2003). " Long-term overexpression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance" *Diabetologia* (in press)
- Field, L. L. (2002). "Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards." *Diabetologia* 45(1): 21-35.
- French, M. B., J. Allison, et al. (1997). "Transgenic expression of mouse proinsulin II prevents diabetes in nonobese diabetic mice." *Diabetes* 46(1): 34-9.
- Gehl, J. and L. M. Mir (1999). "Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation, using a rapid in vivo test for cell permeabilization." *Biochem Biophys Res Commun* 261(2): 377-80.
- Gerstein, H. C. (1994). "Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature." *Diabetes Care* 17(1): 13-9.
- Gorus, F. K. and D. G. Pipeleers (2001). "Prospects for predicting and stopping the development of type 1 of diabetes." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15(3): 371-89.
- Gros, L., L. Montoliu, et al. (1997). "Regulated production of mature insulin by non-beta-cells." *Hum Gene Ther* 8(18): 2249-59.
- Gros, L., E. Riu, et al. (1999). "Insulin production by engineered muscle cells." *Hum Gene Ther* 10(7): 1207-17.
- Groskreutz, D. J., M. X. Sliwkowski, et al. (1994). "Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin." *J Biol Chem* 269(8): 6241-5.
- Hall, R. K., T. Yamasaki, et al. (2000). "Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins." *J Biol Chem* 275(39): 30169-75.
- Harrison, R. L., B. J. Byrne, et al. (1998). "Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue." *FEBS Lett* 435(1): 1-5.
- Hawa, M. I. and R. D. Leslie (2001). "Early induction of type 1 diabetes." *Clin Exp Immunol* 126(2): 181-3.

- Heller, L., M. J. Jaroszeski, et al. (2000). "Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo." *Gene Ther* 7(10): 826-9.
- Hogan, B., Constantini, F. et al. (1986) "Manipulating the mouse embryo-a laboratory manual." Cold Spring harbor Press, NY.
- Hughes, S. D., C. Quaade, et al. (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., A. Vindigni, et al. (1997). "Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide." *Science* 277(5325): 563-6.
- Iynedjian, P. B. (1993). "Mammalian glucokinase and its gene." *Biochem J* 293(Pt 1): 1-13.
- Jaeckel, E., M. Manns, et al. (2002). "Viruses and diabetes." *Ann N Y Acad Sci* 958: 7-25.
- Jetton, T. L., Y. Liang, et al. (1994). "Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut." *J Biol Chem* 269(5): 3641-54.
- Johnson, P. G., S. A. Gallo, et al. (1998). "A pulsed electric field enhances cutaneous delivery of methylene blue in excised full-thickness porcine skin." *J Invest Dermatol* 111(3): 457-63.
- Johnston, C. S. and W. C. Monte (2000). "Infant formula ingestion is associated with the development of diabetes in the BB/Wor rat." *Life Sci* 66(16): 1501-7.
- Julier, C., R. N. Hyer, et al. (1991). "Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility." *Nature* 354(6349): 155-9.
- Jun, H. S., P. Santamaria, et al. (1999). "Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8+ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice." *Diabetes* 48(1): 34-42.
- Kagi, D., B. Odermatt, et al. (1997). "Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice." *J Exp Med* 186(7): 989-97.
- Kahn, B. B. (1992). "Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes." *J Clin Invest* 89(5): 1367-74.
- Kay, T. and Harrison, L. (2000). "Insights from transgenic and gene targeting strategies in Type 1 diabetes in Diabetes mellitus, A Fundamental and Clinical Text" (LeRoith D, O.J., Taylor S, eds.) J.B. Lippincott 441-454.
- Kay, M. A., J. C. Glorioso, et al. (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." *Nat Med* 7(1): 33-40.

- Kelly, M. A., C. H. Mijovic, et al. (2001). "Genetics of type 1 diabetes." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15(3): 279-91.
- Keppler, D and Decker, K (1984). " Glycogen. In *Methods of enzymatic Analysis*" (Bergmeyer, H.U., Ed in Chief) VI 11-18 verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Kikutani, H. and S. Makino (1992). "The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains." *Adv Immunol* 51: 285-322.
- Kojima, H., M. Fujimiya, et al. (2003). "NeuroD-beta cell gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice." *Nat Med* 9(5): 596-603.
- Kukreja, A. and N. K. Maclaren (1999). "Autoimmunity and diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* 84(12): 4371-8.
- Kwon, N. S., S. H. Lee, et al. (1994). "Nitric oxide generation from streptozotocin." *Faseb J* 8(8): 529-33.
- Lamothe, B., A. Baudry, et al. (1998). "Genetic engineering in mice: impact on insulin signalling and action." *Biochem J* 335(Pt 2): 193-204.
- Landgraf, R. (1996). "Impact of pancreas transplantation on diabetic secondary complications and quality of life." *Diabetologia* 39(12): 1415-24.
- Lee, H. C., S. J. Kim, et al. (2000). "Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue." *Nature* 408(6811): 483-8.
- Lee, M. J., S. S. Cho, et al. (2002). "Optimal salt concentration of vehicle for plasmid DNA enhances gene transfer mediated by electroporation." *Exp Mol Med* 34(4): 265-72.
- Lipes, M. A., E. M. Cooper, et al. (1996). "Insulin-secreting non-islet cells are resistant to autoimmune destruction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8595-600.
- Liu, F. and L. Huang (2002). "Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA." *Gene Ther* 9(16): 1116-9.
- Liu, F. and L. Huang (2002). "A syringe electrode device for simultaneous injection of DNA and electrotransfer." *Mol Ther* 5(3): 323-8.
- Liu, M. L., E. M. Gibbs, et al. (1993). "Transgenic mice expressing the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 11346-50.
- Lohr, F., D. Y. Lo, et al. (2001). "Effective tumor therapy with plasmid-encoded cytokines combined with in vivo electroporation." *Cancer Res* 61(8): 3281-4.
- Lombardi, A. M., D. Moller, et al. (1997). "Phenotype of transgenic mice overexpressing GLUT4 and hexokinase II in muscle." *Faseb J* 11(13): 1137-44.
- Lowe, W.L. (1998) "Diabetes Mellitus: principles of molecular medicine." Chapter 47. J.L. Jameson ed. 433-442.

- Lucassen, A. M., C. Julier, et al. (1993). "Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR." *Nat Genet* 4(3): 305-10.
- Ludwig, D. S. and C. B. Ebbeling (2001). "Type 2 diabetes mellitus in children: primary care and public health considerations." *Jama* 286(12): 1427-30.
- Makino, S., K. Kunimoto, et al. (1980). "Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice." *Jikken Dobutsu* 29(1): 1-13.
- Mandarino, L. J., R. L. Printz, et al. (1995). "Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle." *Am J Physiol* 269(4 Pt 1): E701-8.
- Martinenghi, S., G. Cusella De Angelis, et al. (2002). "Human insulin production and amelioration of diabetes in mice by electrotransfer-enhanced plasmid DNA gene transfer to the skeletal muscle." *Gene Ther* 9(21): 1429-37.
- Maruyama, H., M. Sugawa, et al. (2000). "Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using in vivo electroporation." *Hum Gene Ther* 11(3): 429-37.
- Mathis, D., L. Vence, et al. (2001). "beta-Cell death during progression to diabetes." *Nature* 414(6865): 792-8.
- Matschinsky, F. M. (1996). "Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm." *Diabetes* 45(2): 223-41.
- McMahon, J. M., E. Signori, et al. (2001). "Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased expression with reduced muscle damage." *Gene Ther* 8(16): 1264-70.
- Miles, J. M., R. A. Rizza, et al. (1980). "Effects of acute insulin deficiency on glucose and ketone body turnover in man: evidence for the primacy of overproduction of glucose and ketone bodies in the genesis of diabetic ketoacidosis." *Diabetes* 29(11): 926-30.
- Mir, L. M., M. F. Bureau, et al. (1999). "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4262-7.
- Mir, L. M., M. F. Bureau, et al. (1998). "Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle." *C R Acad Sci III* 321(11): 893-9.
- Mitanchez, D., R. Chen, et al. (1998). "Regulated expression of mature human insulin in the liver of transgenic mice." *FEBS Lett* 421(3): 285-9.
- Moller, D. E. (2001). "New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome." *Nature* 414(6865): 821-7.

- Morral, N., R. McEvoy, et al. (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(3): 713-25.
- Muller, A., P. Schott-Ohly, et al. (2002). "Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin." *Immunobiology* 205(1): 35-50.
- Mulligan, R. C. (1993). "The basic science of gene therapy." *Science* 260(5110): 926-32.
- Muzzin, P., R. C. Eisensmith, et al. (1997). "Hepatic insulin gene expression as treatment for type 1 diabetes mellitus in rats." *Mol Endocrinol* 11(6): 833-7.
- Myers, M. A., I. R. Mackay, et al. (2001). "Dietary microbial toxins and type 1 diabetes--a new meaning for seed and soil." *Diabetologia* 44(9): 1199-200.
- Nagata, M. and J. W. Yoon (1992). "Studies on autoimmunity for T-cell-mediated beta-cell destruction. Distinct difference in beta-cell destruction between CD4+ and CD8+ T-cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice." *Diabetes* 41(8): 998-1008.
- Nairn, C., D. N. Galbraith, et al. (1999). "Enterovirus variants in the serum of children at the onset of Type 1 diabetes mellitus." *Diabet Med* 16(6): 509-13.
- Napoli, R., M. F. Hirshman, et al. (1995). "Mechanisms and time course of impaired skeletal muscle glucose transport activity in streptozocin diabetic rats." *J Clin Invest* 96(1): 427-37.
- Neumann, E., S. Kakorin, et al. (1999). "Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes." *Bioelectrochem Bioenerg* 48(1): 3-16.
- Noorchashm, H., N. Noorchashm, et al. (1997). "B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice." *Diabetes* 46(6): 941-6.
- Norris, J. M. and F. W. Scott (1996). "A meta-analysis of infant diet and insulin-dependent diabetes mellitus: do biases play a role?" *Epidemiology* 7(1): 87-92.
- Notkins, A. L. (2002). "Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes." *J Biol Chem* 277(46): 43545-8.
- Oberholzer, J., C. Toso, et al. (2001). "Beta cell replacement for the treatment of diabetes." *Ann N Y Acad Sci* 944: 373-87.
- Otaegui, P. J., T. Ferre, et al. (2000). "Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia." *Hum Gene Ther* 11(11): 1543-52.
- Otaegui, P. J., M. Ontiveros, et al. (2002). "Glucose-regulated glucose uptake by transplanted muscle cells expressing glucokinase counteracts diabetic hyperglycemia." *Hum Gene Ther* 13(18): 2125-33.

- Ou, D., L. A. Mitchell, et al. (2000). "Cross-reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognised by T cells of patients with type I diabetes mellitus." *Diabetologia* 43(6): 750-62.
- Papaccio, G., F. A. Pisanti, et al. (2000). "Multiple low-dose and single high-dose treatments with streptozotocin do not generate nitric oxide." *J Cell Biochem* 77(1): 82-91.
- Pickup, J.a.W., G. (1997) Text book of diabetes, Second edition, Volume 1. Series editor. Blackwell Science LTD.
- Pilkis, S. J. and D. K. Granner (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." *Annu Rev Physiol* 54: 885-909.
- Pipeleers, D., B. Keymeulen, et al. (2002). "A view on beta cell transplantation in diabetes." *Ann N Y Acad Sci* 958: 69-76.
- Postic, C., A. Leturque, et al. (1994). "Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat." *Am J Physiol* 266(4 Pt 1): E548-59.
- Printz, R. L., S. Koch, et al. (1993). "Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution." *J Biol Chem* 268(7): 5209-19.
- Pugliese, A., M. Zeller, et al. (1997). "The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes." *Nat Genet* 15(3): 293-7.
- Rabinovitch, A. (1998). "An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus." *Diabetes Metab Rev* 14(2): 129-51.
- Ramiya, V. K., M. Maraist, et al. (2000). "Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells." *Nat Med* 6(3): 278-82.
- Rea, S. and D. E. James (1997). "Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles." *Diabetes* 46(11): 1667-77.
- Ren, J. M., B. A. Marshall, et al. (1995). "Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice." *J Clin Invest* 95(1): 429-32.
- Riu, E., A. Mas, et al. (2002). "Counteraction of type 1 diabetic alterations by engineering skeletal muscle to produce insulin: insights from transgenic mice." *Diabetes* 51(3): 704-11.
- Rivera, V. M., X. Wang, et al. (2000). "Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum." *Science* 287(5454): 826-30.
- Robbins, M. J., R. A. Sharp, et al. (1980). "Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase." *Diabetologia* 18(1): 55-8.

- Robles, D. T. and G. S. Eisenbarth (2001). "Type 1A diabetes induced by infection and immunization." *J Autoimmun* 16(3): 355-62.
- Roivainen, M., M. Knip, et al. (1998). "Several different enterovirus serotypes can be associated with prediabetic autoimmune episodes and onset of overt IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group." *J Med Virol* 56(1): 74-8.
- Rossini, A. A., M. C. Appel, et al. (1977). "Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia." *Diabetes* 26(10): 916-20.
- Sadeharju, K., M. Lonrot, et al. (2001). "Enterovirus antibody levels during the first two years of life in prediabetic autoantibody-positive children." *Diabetologia* 44(7): 818-23.
- Sakamoto, T., Y. Oshima, et al. (1999). "Target gene transfer of tissue plasminogen activator to cornea by electric pulse inhibits intracameral fibrin formation and corneal cloudiness." *Hum Gene Ther* 10(15): 2551-7.
- Salveti, M., G. Ristori, et al. (2000). "Twins: mirrors of the immune system." *Immunol Today* 21(7): 342-7.
- Schrezenmeir, J. and A. Jagla (2000). "Milk and diabetes." *J Am Coll Nutr* 19(2 Suppl): 176S-190S.
- Shapiro, A. M., J. R. Lakey, et al. (2000). "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen." *N Engl J Med* 343(4): 230-8.
- Singal, D. P. and M. A. Blajchman (1973). "Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus." *Diabetes* 22(6): 429-32.
- Somiari, S., J. Glasspool-Malone, et al. (2000). "Theory and in vivo application of electroporative gene delivery." *Mol Ther* 2(3): 178-87.
- Soria, B., E. Roche, et al. (2000). "Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice." *Diabetes* 49(2): 157-62.
- Spielman, R. S., L. Baker, et al. (1980). "Gene dosage and susceptibility to insulin-dependent diabetes." *Ann Hum Genet* 44(Pt 2): 135-50.
- Stewart, C., N. A. Taylor, et al. (1994). "Insulin-releasing pituitary cells as a model for somatic cell gene therapy in diabetes mellitus." *J Endocrinol* 142(2): 339-43.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993). "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus." *N Engl J Med* 329(14): 977-86

- Thomas, H. E. and T. W. Kay (2000). "Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse." *Diabetes Metab Res Rev* 16(4): 251-61.
- Thomson, G., W. P. Robinson, et al. (1988). "Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus." *Am J Hum Genet* 43(6): 799-816.
- Thule, P. M., J. Liu, et al. (2000). "Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes." *Gene Ther* 7(3): 205-14.
- Treadway, J. L., D. M. Hargrove, et al. (1994). "Enhanced peripheral glucose utilization in transgenic mice expressing the human GLUT4 gene." *J Biol Chem* 269(47): 29956-61.
- Trudeau, J. D., J. P. Dutz, et al. (2000). "Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes?" *Diabetes* 49(1): 1-7.
- Turk, J., J. A. Corbett, et al. (1993). "Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets." *Biochem Biophys Res Commun* 197(3): 1458-64.
- Vafiadis, P., S. T. Bennett, et al. (1997). "Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus." *Nat Genet* 15(3): 289-92.
- Valera, A. and F. Bosch (1994a). "Glucokinase expression in rat hepatoma cells induces glucose uptake and is rate limiting in glucose utilization." *Eur J Biochem* 222(2): 533-9.
- Valera, A., C. Fillat, et al. (1994b). "Regulated expression of human insulin in the liver of transgenic mice corrects diabetic alterations." *Faseb J* 8(6): 440-7.
- Virtanen, S. M., E. Hypponen, et al. (1998). "Cow's milk consumption, disease-associated autoantibodies and type 1 diabetes mellitus: a follow-up study in siblings of diabetic children. Childhood Diabetes in Finland Study Group." *Diabet Med* 15(9): 730-8.
- Wahren, J., K. Ekberg, et al. (2000). "Role of C-peptide in human physiology." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(5): E759-68.
- White, M. F. and C. R. Kahn (1994). "The insulin signaling system." *J Biol Chem* 269(1): 1-4.
- Wilson, G. L., N. J. Patton, et al. (1984). "Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat B cells." *Diabetologia* 27(6): 587-91.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." *Science* 247(4949 Pt 1): 1465-8.

- Wong, F. S., J. Karttunen, et al. (1999). "Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library." *Nat Med* 5(9): 1026-31.
- Wong, F. S., I. Visintin, et al. (1996). "CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells." *J Exp Med* 183(1): 67-76.
- Wright, E. M., E. Turk, et al. (1991). "Molecular genetics of intestinal glucose transport." *J Clin Invest* 88(5): 1435-40.
- Yamazaki, Y., T. Yagi, et al. (2000). "In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker." *J Exp Zool* 286(2): 212-8.
- Yin, H., A. K. Berg, et al. (2002). "Enterovirus RNA is found in peripheral blood mononuclear cells in a majority of type 1 diabetic children at onset." *Diabetes* 51(6): 1964-71.
- Yoon, J. W. and H. S. Jun (2001). "Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus." *Ann N Y Acad Sci* 928: 200-11.
- Yoon, J. W., C. S. Yoon, et al. (1999). "Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells." *Science* 284(5417): 1183-7.
- Yun, J.S. and Wagner, T.E. (1989) "Methods to produce transgenic mice". Edison Center Biotechnology animal-laboratory manual.
- Zekzer, D., F. S. Wong, et al. (1998). "GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice." *J Clin Invest* 101(1): 68-73.
- Zimmet, P., K. G. Alberti, et al. (2001). "Global and societal implications of the diabetes epidemic." *Nature* 414(6865): 782-7.