



Universitat Autònoma de Barcelona

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

CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA

***ESTUDI DEL PAPER DE LA SOBREEXPRESSIÓ
PANCREÀTICA D'IGF-1 EN RATOLINS NOD PER
CONTRARESTAR LA DIABETIS TIPUS 1***

CRISTINA MALLOL DOMÍNGUEZ

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

CRISTINA MALLOL DOMÍNGUEZ

FÀTIMA BOSCH i TUBERT

Setembre del 2014

BELLATERRA

Als meus pares

Aquest treball ha estat possible gràcies en primer lloc a la beca predoctoral FPU, finançada pel Ministerio de Educación, de la que he estat beneficiària durant quatre anys, i a la beca Albert Renold de la *European Foundation for the Study of Diabetes* (EFSD). Les investigacions s'han realitzat gràcies a la financiació rebuda del Ministerio de Economía y Competitividad, Plan Nacional I+D+I (SAF2008-00962 i SAF2011-24698), de la Generalitat de Catalunya (2009 SGR-224), i de la *European Commission DG Research* FP6 (CLINIGENE, LSHB-CT-2006-018933).

°C	Graus centígrads
aa	Aminoàcids
AAV	Virus Adeno-associats
Ad	Adenovirus
ADP	Adenosina difosfat
Ag	Antigen
Akt (PKB)	Proteïna quinasa B
APC	Cèl·lula presentadora d'antigen
ATP	Adenosina-5'-trifosfat
AUC	Àrea per sota de la corba
BAD	Proteïna promotora de mort associada a Bcl-2
BB	Rates BioBreeding
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAG	Promotor híbrid basat en el promotor de la β -actina de pollastre i l' <i>enhancer</i> del Citomegalovirus
CBATEG	Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica
Cdk-4	Ciclina dependent de quinasa 4
Cdks	Ciclins dependents de quinasa
cDNA	DNA còpia
CIP	Inhibidors de les quinases dependents de ciclina
CsCl	Clorur de Cesi
DEPC	Dietilpirocarbonat
dmiRT	Seqüència diana del microRNA-122a i del microRNA-1
DNA	Àcid desoxirribonuclèic
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTP	deoxinucleòtid trifosfat
dsAAV	Vectors adeno-associats de doble cadena
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEUU	Estats Units
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERCP	Colangiopancreatografia endoscòpica retrògrada
Erk-1	Quinases regulades per senyals extracel·lulars 1
ESC	<i>Embryonic Stem Cells</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
Fas	Fas, receptor de mort cel·lular
FasL	Lligand de Fas
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
g	Grams
GADA	Autoanticossos contra l'àcid glutàmic descarboxilasa
GCK	Glucoquinasa
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GH	Hormona del creixement
GLP-1	<i>Glucagon like peptide-1</i>
GLUT-2	Transportador de glucosa 2
GLUT-4	Transportador de glucosa 4

GTT	Test de tolerància a la glucosa
gv	Genomes virals
HG	Hiperglucèmic
HGF	Factor de creixement dels hepatòcits
HNF-1α/β	Factor nuclear d'hepatòcits 1 α/β
HS	<i>Horse Serum</i>
HTV	Injecció hidrodinàmica per la vena de la cua
IAA	Autoanticossos contra la insulina
IFN-α	Interferó α
IFN-β	Interferó β
IFN-γ	Interferó γ
IGF-1	Factor de creixement similar a la insulina tipus 1
IGF-1R	Receptor del factor de creixement similar a la insulina tipus 1
IGF-2	Factor de creixement similar a la insulina 2
IGFBP	Proteïnes d'unió als factors de creixement similars a la insulina
IGFs	Factors de creixement similars a la insulina
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
INK	Proteïnes inhibidores de quinases
<i>Ins1</i>	<i>Insulina 1</i>
<i>Ins2</i>	<i>Insulina 2</i>
IP-10	<i>IFN-inducible protein-10</i>
IPF-1	Factor promotor de la insulina
iPS	Cèl·lules pluripotencial induïdes
IR	Receptor de la insulina
IRSs	Substrats del receptor de la insulina
ITR	Repeticions Terminal Invertides
kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons
KIP	Inhibidors de les quinases dependents de ciclina
LV	Lentivirus
MAPK	Proteïnes quinases activades per mitògens
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant protein-1</i>
mg	Mil·ligrams
MHC-I	Complex major d'histocompatibilitat 1
MHC-II	Complex major d'histocompatibilitat 2
MIG	<i>Monokine induced by IFN-γ</i>
MIP-1α	<i>Macrophage inflammatory protein-1α</i>
MIP-1β	<i>Macrophage inflammatory protein-1β</i>
miRNA	MicroRNA
miRT-1	Seqüència diana per al microRNA de cor 1
miRT-122a	Seqüència diana per al microRNA de fetge 122a
MLDSTZ	<i>Multiple Low Dose Streptozotocin</i>
mM	Milimolar
MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the Young</i>

mRNA	RNA missatger
N	Generació
ND	No detectat
NF-κB	Factor de transcripció nuclear Kappa B
NG	Normoglucèmic
NK	Cèl·lules <i>natural killers</i>
nm	Nanòmetres
NO	Òxid nítric
NOD	<i>Non-obese diabetic mice</i>
NOD-IGF1	Ratolí transgènic NOD RIP-1/IGF-1
ORF	Pauta oberta de lectura
P	Fosfat
pA	Poly A, seqüència de poliadenilació
PBS	Tampó fosfat-salí
PBS	Tampó fosfat-salí
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pdx-1	<i>Pancreatic duodenal homeobox 1 gene</i>
PEG	Poliètilenglicol
PI3K	Fosfo-inositol-3-quinasa
PKB	Proteïna quinasa B
PLNs	Nòduls limfàtics pancreàtics
PP	Polipèptid pancreàtic
qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa
RB	<i>Roller bottle</i>
RIA	Radioimmunoassaig
RIP-1	Promotor del gen de la insulina 1 de rata
RIP-1/IFN-β	Gen quimèric promotor RIP-1 – cDNA IFN- β humà
RIP-1/IGF-1	Gen quimèric promotor RIP-1 – cDNA de l'IGF-1 murí
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	Revolucions per minut
RT	Reacció de la transcriptasa inversa
RT	Retrovirus
s	Segons
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforèsi en gels de poliacrilamida
SEM	Error estàndard de la mitja
SPF	Instal·lacions lliures de patògens
STZ	Estreptozotocina
T1D	Diabetis tipus 1
T2D	Diabetis tipus 2
TAE	Tampó tris-acetat-EDTA
TCR	<i>T cell receptor</i>
TdT	Dideoxinucleotiltransferasa
TE	Tampó tris-EDTA
Teff	Cèl·lules T efectores
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>

TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	Limfòcits T reguladors
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometà
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick labeling</i>
u.a.	Unitats arbitràries
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
V	Volts
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>
VP1	Proteïnes estructurals de la càpside 1
VP2	Proteïnes estructurals de la càpside 2
VP3	Proteïnes estructurals de la càpside 3
x g	Unitats de l'acceleració de la gravetat
μg	Micrograms
μl	Microlitres

I. PRESENTACIÓ	1
II. INTRODUCCIÓ	3
1. EL PÀNCREES	3
1.1. Estructura i funció del pàncrees	3
1.2. Cèl·lules endocrines de l'illot de Langerhans.....	4
1.3. Funcionalitat de la cèl·lula β	7
1.3.1. Regulació de l'expressió del gen de la insulina	7
1.3.2. Regulació de la secreció de la insulina.....	8
1.3.3. Acció de la insulina a nivell sistèmic: homeòstasi de la glucosa.....	10
1.4. Regulació de la massa de cèl·lula β	11
1.4.1. Control de la replicació de la cèl·lula β : Cicle cel·lular	12
2. DIABETIS.....	15
2.1. Diabetis tipus 1.....	16
2.1.1. Patogènia de la diabetis tipus 1	16
2.1.2. Característiques generals de la resposta immunitària	17
2.1.3. Mecanisme de l'atac autoimmune contra les cèl·lules β	19
2.1.4. Control dels mecanismes de tolerància i autoimmunitat per les cèl·lules T reguladores.....	21
2.2. Tractaments actuals per a la diabetis tipus 1.....	23
2.3. Models animals de la diabetis tipus 1.....	24
2.3.1. Models induïts experimentalment.....	24
2.3.1.1. Models induïts amb agents químics	24
2.3.1.2. Models d'animals transgènics.....	25
2.3.2. Models espontanis de diabetis	26
3. EL RATOLÍ NOD: <i>Non-Obese Diabetic</i>.....	27
3.1. Descripció del model	27
3.2. Susceptibilitat genètica: defectes en el sistema immune.....	28
3.3. Caracterització de la insulitis	29

4. FACTOR DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA-1 (IGF-1)	31
4.1. Patró d'expressió i regulació del factor IGF-1.....	31
4.2. Cascada de la senyalització del factor IGF-1 a les cèl·lules β	32
4.3. IGF-1 i prevenció de la diabetis.....	35
4.3.1. Teràpies amb proteïna IGF-1 recombinant.....	35
4.3.2. Animals transgènics que expressen IGF-1 en les cèl·lules β	36
5. TERÀPIA GÈNICA	37
5.1. Introducció a la teràpia gènica.....	37
5.2. Vectors virals.....	38
5.3. Vectors virals adeno-associats (AAV).....	39
5.3.1. Biologia dels virus AAV.....	39
5.3.2. Vectors AAV recombinants.....	41
5.4. Transferència de gens al pàncrees.....	44
III. OBJECTIUS	47
IV. RESULTATS	49
<u>PART I. ESTUDI DEL PAPER D'IGF-1 EN LA PRESERVACIÓ DE LA MASSA DE CÈL·LULA β EN EL MODEL NOD</u>	
1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DELS ANIMALS TRANSGÈNICS NOD-IGF1	49
1.1. Obtenció del ratolí transgènic NOD-IGF1.....	49
1.2. Anàlisi de la sobreexpressió d'IGF-1 als illots dels ratolins transgènics NOD-IGF1.....	50
1.3. Determinació dels nivells circulants d'IGF-1.....	51
2. ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT ESPONTANI DE DIABETIS EN ELS ANIMALS NOD-IGF1	53
2.1. Anàlisi de la incidència de diabetis en els ratolins NOD-IGF1.....	53
2.2. Seguiment de la glucèmia amb l'edat.....	54

3. FUNCIONALITAT DE LA CÈL·LULA β EN ELS RATOLINS TRANSGÈNICS NOD-IGF1	57
3.1. Anàlisi de la tolerància a la glucosa: pre-diabetis	57
3.2. Anàlisi de la tolerància a la glucosa: inici de diabetis.....	58
3.3. Anàlisi de la tolerància a la glucosa: diabetis oberta	59
4. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS A L'INICI DE LA DIABETIS	61
5. ESTUDI MORFOLÒGIC DEL PÀNCREES EN INDIVIDUS PRE-DIABETICS	62
5.1. Distribució de les cèl·lules endocrines de l'illot.....	62
5.2. Distribució dels illots de Langerhans en el pàncrees	63
5.3. Determinació de la massa de cèl·lula β a les diferents etapes d'evolució del procés diabètic.....	65
6. CARACTERITZACIÓ DE LA REPLICACIÓ DE LES CÈL·LULES β EN L'ETAPA PRE-DIABETIS	68
6.1. Determinació de la taxa de replicació mitjançant l'anàlisi histològica del marcador de replicació Ki67	68
6.2. Anàlisi de l'expressió gènica de factors implicats en la regulació del cicle cel·lular.....	70
7. CARACTERITZACIÓ DE LA MORT CEL·LULAR DE LES CÈL·LULES β EN ELS RATOLINS TRANSGÈNICS NOD-IGF1 EN L'ETAPA PRE-DIABETIS	72
7.1. Anàlisi histològica de la taxa d'apoptosi en els illots pancreàtics	72
7.2. Estudi de la via de senyalització de la PKB/AKT en els ratolins transgènics NOD-IGF1	74
8. CARACTERITZACIÓ DEL PROCÉS INFLAMATORI EN ELS PÀNCREES DELS ANIMALS TRANSGÈNICS NOD-IGF1	76
8.1. Anàlisi histològica del grau d'insulitis en els illots pancreàtics dels animals transgènics NOD-IGF1	76
8.2. Estudi de l'expressió de citokines inflamatòries als illots pancreàtics dels animals NOD-IGF1	79
8.3. Estudi de l'expressió de molècules presentadores d'antigen en els illots pancreàtics dels animals NOD-IGF1	81

9. DETERMINACIÓ DE SUBPOBLACIONS LIMFOCITÀRIES MITJANÇANT CITOMETRIA DE FLUX.....	84
9.1. Anàlisi del percentatge de cèl·lules T reguladores	84
<u>PART II. APROXIMACIÓ DE TERÀPIA GÈNICA DIRIGIDA AL PÀNCREES BASADA EN LA TRANSFERÈNCIA D'IGF-1 PER CONTRARRESTAR LA DIABETIS AUTOIMMUNE EN EL RATOLÍ NOD</u>	
1. ANTECEDENTS	87
2. INFECTIVITAT I TROPISME DEL VECTOR AAV8 AL PÀNCREES DE RATOLINS NOD PRE-DIABÈTICS	88
2.1. Anàlisi de la transducció del vector AAV8 administrat localment a femelles NOD de 4 setmanes.....	88
2.1.1. Transducció del pàncrees.....	89
2.1.2. Transducció d'altres teixits perifèrics	90
2.2. Modulació del tropisme de vectors AAV mitjançant l'ús de seqüències diana de microRNAs.....	91
2.2.1. Anàlisi de l'expressió del microRNA-122a al fetge dels ratolins NOD	92
2.2.2. Anàlisi de l'expressió del microRNA-1 al cor dels ratolins NOD	93
3. CONSTRUCCIÓ D'UN VECTOR VIRALS ADENOASSOCIAT CODIFICANT PER LA PROTEÏNA IGF-1 MURINA	95
3.1. Comprovació de l'expressió del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	95
3.1.1. Transfecció del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT en cèl·lules INS-1	96
3.1.2. Transfecció del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT en cèl·lules C2C12: funcionalitat de la seqüència diana del microRNA-1.....	97
3.1.3. Administració hidrodinàmica del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT en ratolins ICR: funcionalitat de la seqüència diana del microRNA-122a a fetge	98
3.2. Producció dels vectors AAV8-CAG-IGF1-dmiRT per a la transferència gènica del pàncrees en els ratolins NOD.....	99
3.2.1. Anàlisi de la infectivitat i expressió <i>in vivo</i> del vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT en ratolins NOD.....	100

4. ESTUDI DE LA PREVENCIÓ DE DIABETIS EN RATOLINS NOD ADMINISTRATS AMB EL VECTOR AAV8-CAG-IGF1-dmiRT	104
4.1. Expressió d'IGF-1 en els pàncrees dels animals administrats amb AAV8-CAG-IGF1-dmiRT	105
4.2. Seguiment de la glucèmia amb l'edat en els animals injectats amb AAV8-CAG-IGF1-dmiRT	105
4.3. Anàlisi de la incidència de diabetis.....	107
 V. DISCUSSIÓ	109
 PART I. ESTUDI DEL PAPER D'IGF-1 EN LA PRESERVACIÓ DE LA MASSA DE CÈL·LULA β EN EL MODEL NOD.....	109
 PART II. APROXIMACIÓ DE TERÀPIA GÈNICA DIRIGIDA AL PÀNCREES BASADA EN LA TRANSFERÈNCIA D'IGF-1 PER CONTRARRESTAR LA DIABETIS AUTOIMMUNE EN EL RATOLÍ NOD.....	116
 VI. CONCLUSIONS.....	121
 VII. MATERIALS I MÈTODES.....	125
1. MATERIALS	125
1.1. Animals	125
1.2. Soques bacterianes	125
1.3. Anticossos.....	126
1.4. Reactius	127
1.5. Plasmidis.....	127
2. MÈTODES	128
2.1. Tècniques bàsiques de DNA.....	128
2.1.1. Preparació del DNA plasmídic.....	128
2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció	128
2.1.3. Desfosforilació de fragments de DNA	129
2.1.4. Generació d'extrems roms de fragments de DNA	129
2.1.5. Construcció de molècules híbrides: lligació	129

2.1.6. Transformació en cèl·lules competents <i>E.coli</i> XL2-blue	129
2.1.7. Obtenció del DNA i purificació.....	130
2.2. Cèl·lules eucariotes en cultiu.....	130
2.2.1. Cèl·lules <i>Ins-1</i>	130
2.2.2. Cèl·lules <i>C2C12</i>	131
2.2.3. Cèl·lules <i>HEK-293</i>	131
2.2.4. Transfecció de DNA en cèl·lules en cultiu	131
2.3. Genotipat dels animals transgènics <i>NOD-IGF1</i>	132
2.3.1. Purificació del DNA genòmic dels ratolins.....	132
2.3.2. Genotipat per <i>PCR</i>	132
2.4. Producció, purificació i titulació dels vectors virals adenoassociats.....	133
2.4.1. Producció i purificació.....	133
2.4.2. Titulació de genomes virals	134
2.4.3. Quantificació de les partícules virals per tinció de plata.....	135
2.5. Determinació de genomes virals en teixits per <i>qPCR</i>	136
2.5.1. Generació de la recta patró de referència.....	136
2.5.2. Quantificació del nombre de còpies del transgèn per <i>qPCR</i>	136
2.6. Injecció <i>in vivo</i> dels vectors virals.....	137
2.6.1. Administració retrògrada pel ducte pancreaticobillar	137
2.6.2. Administració hidrodinàmica	138
2.7. Aïllament dels illots pancreàtics.....	139
2.8. Anàlisi d'expressió del mRNA per <i>qPCR</i>	140
2.8.1. Extracció de RNA total.....	140
2.8.2. Extracció de RNA dels illots pancreàtics	140
2.8.3. Síntesi de cDNA.....	141
2.8.4. <i>PCR</i> quantitativa.....	141
2.9. Anàlisi d'expressió dels miRNA per <i>qPCR</i>	142
2.9.1. Extracció de miRNA dels teixits.....	142
2.9.2. Síntesi de cDNA.....	142
2.9.3. <i>PCR</i> quantitativa.....	143

2.10. Extracció i anàlisi de proteïnes	143
2.10.1. Extracció de proteïnes d'illots pancreàtics.....	143
2.10.2. Determinació de la concentració de proteïnes	144
2.10.3. Anàlisi de l'expressió de proteïnes mitjançant Western Blot	144
2.10.3.1. Electroforèsi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	144
2.10.3.2. Transferència de proteïnes a membranes i immunodetecció	144
2.11. Determinació de paràmetres sèrics.....	145
2.11.1. Glucosa	145
2.11.2. Insulina.....	146
2.11.3. IGF1.....	146
2.11.4. Triglicèrids.....	146
2.11.5. Àcids grassos lliures.....	146
2.11.6. β -hidroxibutirat.....	146
2.12. Test de tolerància a la glucosa	147
2.13. Anàlisi immunohistoquímica del pàncrees	147
2.13.1. Determinació de la massa de cèl·lula β	148
2.13.2. Detecció d'apoptosi a la cèl·lula β (TUNEL)	148
2.13.3. Detecció de la replicació de la cèl·lula β	148
2.13.4. Determinació del grau d'insulitis.....	149
2.14. Anàlisi de subpoblacions limfocitàries mitjançant citometria de flux	149
2.14.1. Aïllament de leucòcits del pàncrees.....	149
2.14.2. Aïllament de leucòcits dels nòduls limfàtics pancreàtics	150
2.14.3. Aïllament de leucòcits de la melsa	150
2.14.4. Marcatge de la superfície cel·lular per FACS.....	151
2.15. Anàlisi estadística.....	151

VIII. BIBLIOGRAFIA.....	153
--------------------------------	------------

I. PRESENTACIÓ

La diabetis tipus 1 (T1D) és una malaltia autoimmunità causada per la destrucció de les cèl·lules β productores d'insulina. La incidència de la T1D està augmentant arreu del món i cada vegada es diagnostica a edats més joves. Aquesta malaltia esdevé clínicament aparent després d'un període preclínic de longitud variable, durant el qual la destrucció autoimmunità redueix la massa de cèl·lula β en l'illot pancreàtic de tal manera que els nivells de glucosa en sang no es poden continuar mantenint en un rang fisiològic. Donat que els pacients de T1D requereixen teràpia amb insulina al llarg de tota la seva vida i presenten un elevat risc de complicacions secundàries, noves teràpies preventives o curatives són necessàries. Entre elles, la teràpia gènica ofereix una nova eina de tractament amb grans possibilitats.

Entre els possibles gens candidats al tractament de la diabetis, el factor de creixement a la insulina tipus 1 (IGF-1) destaca per les seves propietats immunomoduladores i el seu control sobre la proliferació i supervivència de la massa de cèl·lula β . El nostre laboratori havia descrit prèviament que la sobreexpressió d'IGF-1 a les cèl·lules β d'animals transgènics contrarresta la citotoxicitat i la insulitis induïda pel tractament amb estreptozotocina (STZ) i potencia la regeneració de l'illot. A més, també ha demostrat que l'expressió pancreàtica d'IGF-1 prevé la destrucció de l'illot i la mort de la cèl·lula β en un ratolí transgènic que sobreexpresca interferó- β (IFN- β) a la cèl·lula β , un model d'infiltració limfocítica del pàncrees endocrí.

La primera part d'aquest treball es va centrar en l'estudi del paper d'IGF-1 en la preservació de la massa de cèl·lula β en un model espontani de diabetis autoimmunità: el ratolí NOD (*Non Obese Diabetic*). Amb l'objectiu d'estudiar el mecanisme mitjançant el qual la sobreexpressió d'IGF-1 en les cèl·lules β pot prevenir la destrucció autoimmunità del pàncrees endocrí, es van generar ratolins NOD transgènics que sobreexpresaven IGF-1 sota el control del promotor RIP-1 (*Rat Insulin Promoter-1*) (NOD-IGF1).

Els resultats obtinguts van mostrar que els ratolins transgènics NOD-IGF1 eren resistents al desenvolupament de diabetis. Davant una prevalença del 70% en els ratolins NOD, només un 3% dels ratolins NOD-IGF1 desenvolupaven diabetis a les 30 setmanes d'edat. Aquesta prevenció era mediada per un efecte local d'IGF-1 al pàncrees donat que els nivells circulants del factor no estaven augmentats. La reducció en la incidència de diabetis observada en els animals NOD-IGF1 tenia lloc en paral·lel amb una menor infiltració limfocítica dels illots, menor expressió de citoquines inflamatòries i reducció del nombre de cèl·lules β apoptòtiques, suggerint un bloqueig de l'atac autoimmunità contra el

pàncrees. Aquest bloqueig podria estar mediat per una reducció de les molècules presentadores d'antígens en els illots i un augment de les cèl·lules T reguladores en el pàncrees. Els ratolins NOD-IGF1 preservaven la massa de cèl·lula β amb el temps, presentaven una insulinèmia normal i mostraven un perfil de tolerància a la glucosa normal després de ser administrats amb una càrrega de glucosa intraperitoneal.

Tots aquests resultats indicaven que la producció local d'IGF-1 podia protegir les cèl·lules β de la destrucció induïda pel sistema immune i contrarestava la diabetis en una varietat de models de la malaltia que inclou el ratolí amb desenvolupament espontani de diabetis NOD. Per tant, la transferència del gen IGF-1 a pàncrees podria ser una aproximació segura per al tractament de la diabetis tipus 1. A més, estudis realitzats en el nostre laboratori han demostrat que l'administració intraductal de vectors virals adenoassociats de serotip 8 (AAV8) és capaç de transduir de manera eficient i a llarg termini tant el pàncrees exocrí com les cèl·lules β dels illots.

Per tant, l'objectiu de la segona part d'aquest treball va ser combinar l'ús dels vectors AAV8 amb els efectes protectors de l'IGF-1 per a desenvolupar una estratègia de teràpia gènica dirigida al pàncrees per a contrarestar la diabetis autoimmune en el ratolí NOD. Amb aquesta finalitat es va generar un vector AAV8 que expressava IGF-1 sota el control del promotor d'expressió ubiqua CAG. Per tal de restringir l'expressió d'IGF-1 al pàncrees es van incorporar al constructe les seqüències diana del microRNA 122a (expressat al fetge) i del miRNA 1 (expressat al cor) a l'extrem 3'-UTR del constructe. Es va observar que l'administració intraductal d'aquest vector era capaç de prevenir la hiperglucèmia en el ratolí NOD. Així, la majoria dels animals administrats amb el vector AAV8 que codificava per IGF-1 van mostrar valors normals de glucèmia al llarg de les 28 setmanes de seguiment i la incidència de diabetis es va veure significativament reduïda.

En conjunt, aquest estudi posa de manifest el paper clau d'IGF-1 en la protecció de la massa de cèl·lula β enfront la destrucció autoimmune, i indica que la transferència gènica d'IGF-1 a pàncrees mitjançant vectors AAV podria representar una nova aproximació de teràpia gènica per la diabetis tipus 1.

II. INTRODUCCIÓ

1. EL PÀNCREES

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

1.1. Estructura i funció del pàncrees

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

El pàncrees exocrí constitueix aproximadament el 80-85% del total de les cèl·lules pancreàtiques, formant agrupacions de cèl·lules epitelials, anomenades cèl·lules acinars, orientades en sentit radial formant una llum, el lumen, que comunica amb els conductes pancreàtics. Aquests formen un entramat de comunicació entre els acinis i la llum del duodè (Figura 1). La funció de les cèl·lules acinars és la de síntesi, reservori i secreció dels enzims digestius pancreàtics actius com les proteases, lipases i amilases; així com també dels zimògens inactius com la tripsina i l'elastasa. La xarxa ramificada de l'epiteli ductal, que convergeix en el conducte pancreàtic principal, transporta els enzims digestius a l'intestí, on contribueixen a la digestió dels aliments.

La fracció endocrina del pàncrees constitueix només un 1-2% de la massa total del pàncrees adult i està format pels illots de Langerhans, tot i que, també es poden trobar cèl·lules endocrines aïllades (Rahier et al., 1981). Els illots estan dispersos irregularment en tot el parènquima exocrí, amb major densitat a la zona de la cua del pàncrees. A més, estan envoltats per una càpsula de teixit connectiu característica que els aïlla del teixit exocrí i els ajuda a mantenir la seva integritat estructural (Figura 1).

L'illot és un mosaic cel·lular amb diversos tipus de cèl·lules que secreten diferents hormones al torrent sanguini. Els illots es troben abundantment irrigats per una microvasculatura molt ben desenvolupada i selectivament innervats. Així, les hormones produïdes són ràpidament alliberades directament als capil·lars sanguinis i, a través de la vena porta, són transportades cap al fetge i a la resta de l'organisme. D'aquesta manera

poden actuar a nivell endocrí en òrgans distants com ara al fetge o als músculs, així com localment en les cèl·lules pròpies de l'illot, regulant així la seva funció (Cabrerera et al., 2006).

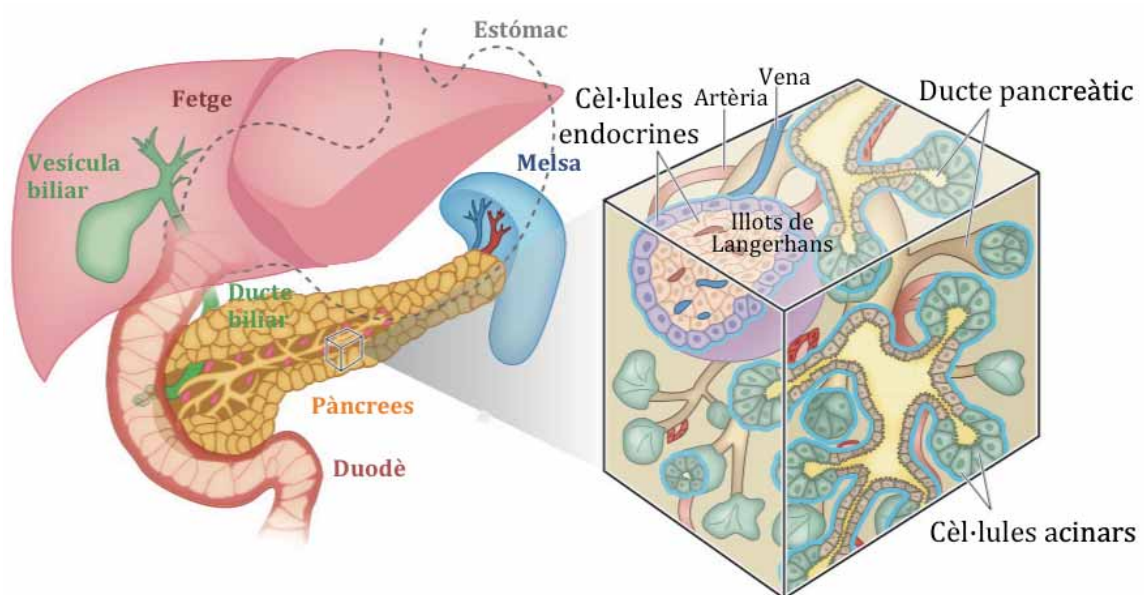


Figura 1. Localització i estructura del pàncrees. El pàncrees es troba de forma adjacent al duodè i a prop de l'estómac. El pàncrees exocrí constitueix la major part de la glàndula i es compon principalment de les cèl·lules acinars i la xarxa ramificada dels ductes. El pàncrees endocrí està format pels illots de Langerhans, que es troben per tot el parènquima exocrí. Els illots contenen diferents tipus de cèl·lules endocrines. (Imatge adaptada Shih et al., 2013).

1.2. Cèl·lules endocrines de l'illot de Langerhans

Els illots de Langerhans presenten cinc tipus cel·lulars diferents, cadascun dels quals secreta una hormona diferent i presenta una distribució característica dins de l'illot. (Figura 2).

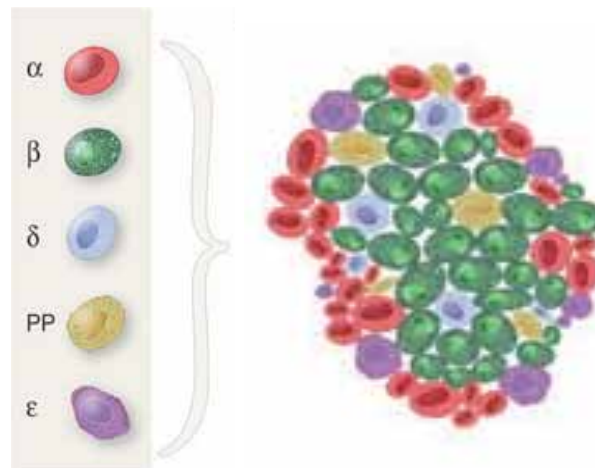


Figura 2. Estructura de l'illot pancreàtic. Patró de distribució dels diferents tipus de cèl·lules que componen l'illot de Langerhans. (Imatge adaptada de JP Cartailier, *Beta Cell Biology Consortium*).

Les **cèl·lules α** alliberen glucagó i es localitzen a la perifèria de l'illot constituint en ratolins del 15 al 20% de cèl·lules. En canvi, a l'home constitueixen el 40% del total de les cèl·lules endocrines (Brissova et al., 2005; Stefan et al., 1982). Per a la inducció de la glucogenòlisi i la gluconeogènesi, durant el dejuni, l'hormona glucagó produïda per la cèl·lula α manté els nivells de glucosa en sang constants, en els ratolins entre valors de 60 a 175 mg/dl i en els humans de 80 a 120 mg/dl.

Les **cèl·lules β** secretores d'insulina es troben agrupades al centre de l'illot i són les més abundants, essent en els ratolins del 60 al 70% mentre que en l'home representen el 50% de les cèl·lules endocrines (Brissova et al., 2005; Stefan et al., 1982).

El glucagó i la insulina actuen antagonicament segons l'estat de l'individu (en dejuni o en alimentació), augmentant o disminuint els nivells de glucosa, respectivament. La insulina és l'única hormona capaç de disminuir els nivells de glucosa en sang i induir l'absorció postprandial de la glucosa a les cèl·lules.

Les **cèl·lules δ** representen el 10% de les cèl·lules dels illots humans i alliberen la hormona somatostatina. Aquesta és una hormona important que regula la producció i l'alliberament d'altres hormones, inhibeix la secreció de glucagó i d'insulina entre d'altres. Aquestes cèl·lules estan situades a la perifèria i a prop dels capil·lars de l'illot.

Les **cèl·lules PP** (5% de les cèl·lules endocrines humanes) produeixen el polipèptid pancreàtic que té efectes reguladors en l'activitat secretora del pàncrees i d'altres glàndules. L'hormona s'allibera en resposta a l'alimentació. S'ha demostrat que actua a

nivell del sistema nerviós central per reduir la gana i la ingesta d'aliments. Són cèl·lules situades a la perifèria i prop dels capil·lars dels illots (Batterham et al., 2003).

Les **cèl·lules ϵ** representen <1% de les cèl·lules de l'illot i es troben distribuïdes a l'atzar a l'interior de l'illot. Aquestes cèl·lules produeixen l'hormona grelina, la qual és estimuladora de la ingesta (Prado et al., 2004). A més, s'ha demostrat que la grelina té un paper central en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa en afectar negativament l'alliberament d'insulina (Broglia et al., 2001, 2003; Tong et al., 2010; Yada et al., 2008), positivament l'alliberament de glucagó, així com reduint la somatostatina i el PP (Chuang et al., 2011; Qader et al., 2005, 2008). D'altra banda, s'han mostrat efectes protectors contra l'apoptosi de les cèl·lules β (Granata et al., 2007) i sobre la seva regeneració després de la destrucció pancreàtica induïda per fàrmacs com l'estreptozotocina (STZ) (Granata et al., 2010).

La descripció anterior correspon a l'estructura dels illots de rosegadors (Figura 2) i es basa en el tipus d'illot prototípic, descrit en molts llibres de text. La clara separació dels tipus cel·lulars en les diferents regions de l'illot suggereix que hi ha subdivisions anatòmiques en l'illot dels rosegadors (Orci and Unger, 1975) i aquesta arquitectura única sembla tenir algunes implicacions funcionals (Cabrera et al., 2006). No obstant existeix una gran variabilitat entre espècies pel que fa a la composició de les cèl·lules i l'estructura de l'illot. En illots humans i en primats no humans, les cèl·lules β no estan agrupades a l'interior de l'illot i tenen més cèl·lules productores de glucagó que en els rosegadors (Bosco et al., 2010). D'altra banda, els illots de porc semblen estar formats per diverses subunitats més petites que s'assemblen als illots de ratolí (Cabrera et al., 2006).

Tot i que les cèl·lules endocrines són el principal component cel·lular de l'illot, també s'hi troben altres tipus cel·lulars no endocrins, que configuren la innervació i la irrigació sanguínia de l'illot. Les terminacions nervioses que arriben als illots estan formades pels axons de neurones i per cèl·lules astroglials anomenades **cèl·lules de Schwann**. Aquests cèl·lules formen una xarxa al voltant dels illots que els embolcalla i que separa les cèl·lules endocrines del teixit connectiu i del teixit exocrí (Sunami et al., 2001). Les cèl·lules que configuren la vascularització de l'illot són les cèl·lules de l'**endoteli vascular** i constitueixen una part important del volum dels illots. Es tracta de cèl·lules fenestrades fortament unides entre elles per unions estretes o oclusives que permeten l'accés directe de les cèl·lules endocrines al torrent sanguini (Ballian and Brunicardi, 2007; Olsson and Carlsson, 2006).

1.3. Funcionalitat de la cèl·lula β

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

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

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

La seqüència del gen de la insulina està altament conservada durant l'evolució. Així, la insulina dels vertebrats més primitius i la de l'home difereixen únicament en unes poques bases. A la majoria d'espècies es presenta com un gen d'una sola còpia. En el cas dels humans, per exemple, es localitza en el cromosoma 11, entre els gens de la *tirosina hidroxilasa* i el del *factor de creixement similar a la insulina 2 (IGF-2)*. Els rosegadors, en canvi, tenen dues còpies del gen de la insulina: la *insulina 1 (Ins1)*, que seria el resultat d'una duplicació gènica del gen original de la insulina i es localitza al cromosoma 19; i la *insulina 2 (Ins2)*, probablement el gen homòleg a la insulina humana localitzat al cromosoma 7 (Wentworth et al., 1986). Tot i codificar per la mateixa proteïna, aquests dos gens tenen diferents patrons d'expressió: el gen original, *Ins2* es detecta a partir del dia embrionari e8.5, i s'expressa a nivell de pàncrees, fetge, timus i cervell; en canvi, el gen *Ins1* inicia la seva expressió a dia embrionari e9.5 i en adults només s'expressa a nivell de pàncrees i de retina (Budd et al., 1993; Deltour et al., 1993). L'especificitat d'expressió del gen de la insulina està controlada per múltiples seqüències reguladores majoritàriament localitzades en el seu promotor, on s'hi uneixen factors de transcripció (Wilson et al., 2003).

La síntesi de la insulina és un procés complex que involucra la formació de dues molècules precursors, la preproinsulina i la proinsulina. Un cop transcrita, la preproinsulina passa del ribosoma al reticle endoplasmàtic on és degradada per proteases específiques que separen el pèptid senyal i d'aquesta manera és transformada a proinsulina. Aquesta és processada a insulina dins dels grànuls que provenen de l'aparell de Golgi. En aquests grànuls, les proteases, activades per un pH àcid, trenquen el pèptid de

connexió anomenat *pèptid C*, que uneix les cadenes A i B de la insulina, alliberant-se la insulina madura la qual és la que té activitat biològica. Aquesta insulina madura està constituïda per 51 aminoàcids repartits en les dues cadenes polipeptídiques A (21aa) i B (30aa) unides per dos ponts disulfur intercatenaris.

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

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

1.3.2. Regulació de la secreció de la insulina

Està molt ben caracteritzat el mecanisme pel qual els nivells de glucosa en sang estimulen la secreció de la insulina (Figura 3). La glucosa entra dins de la cèl·lula β a través del transportador de glucosa GLUT-2, que presenta una afinitat molt elevada per aquest monosacàrid i permet la seva entrada. Un cop dins de la cèl·lula β , la glucosa és fosforilada per l'enzim Glucoquinasa (GCK) donant lloc a la formació de glucosa-6-P, la qual entra a la via de la glucòlisi. L'enzim GCK o Hexoquinasa IV es caracteritza per una elevada *K_m* per la glucosa (de 5 a 8 mM), de manera que té la màxima activitat a concentracions postprandials i no pot ser inhibida pel producte de la seva acció, la glucosa-6-P (Printz et al., 1993). Així doncs, el transportador GLUT-2 i la GCK actuen conjuntament com a sensors de la glucosa, modulant la secreció d'insulina enfront els canvis de concentració de glucosa circulants.

El metabolisme de la glucosa dins la cèl·lula β , a través de la glucòlisi i del cycle de Krebs, genera ATP i, és precisament l'increment del ratio ATP/ADP el que activa la secreció d'insulina. L'augment d'ATP intracel·lular provoca la despol·larització de la membrana que indueix l'obertura dels canals de calci (Ca^{2+}) dependents de voltatge i provoca l'entrada de Ca^{2+} i el consegüent increment de la seva concentració a l'interior de la cèl·lula. Finalment, tota aquesta cascada de senyals dóna lloc a la fusió dels grànuls de secreció amb la membrana plasmàtica i la secreció d'insulina (Figura 3).

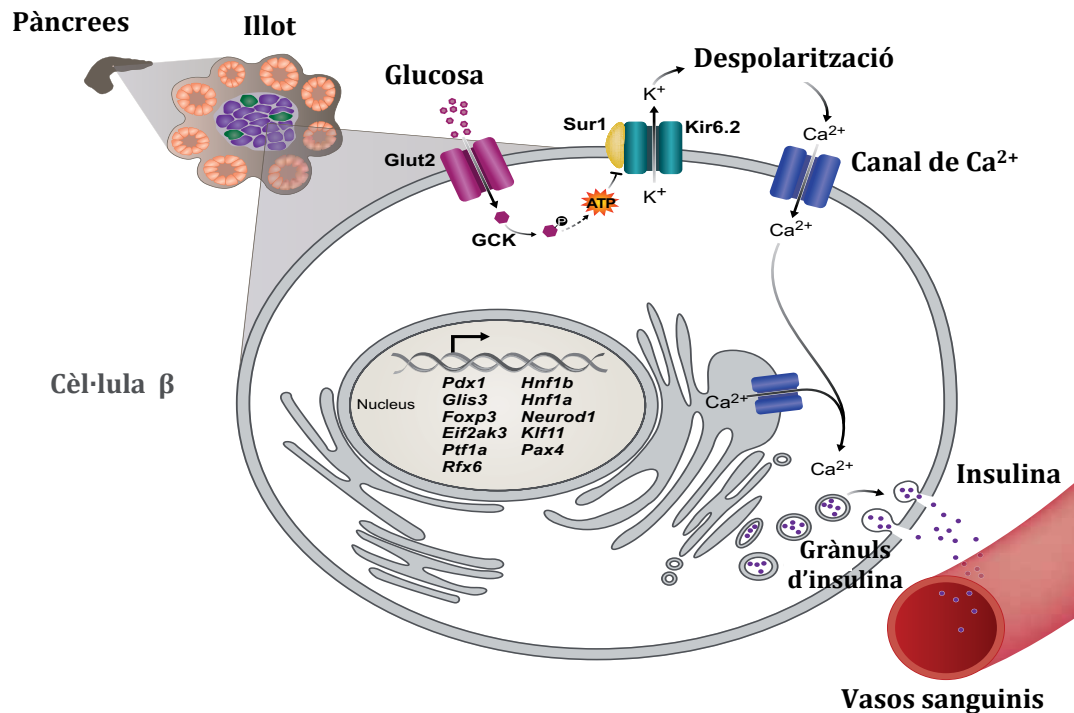


Figura 3. Secreció de la insulina en resposta a la glucosa. La glucosa entra a la cèl·lula β a través del transportador GLUT-2 i és fosforilada per l'enzim glucoquinasa (GSK3). La glucosa-6-P entra a la glucòlisi i al cycle de Krebs augmentant l'ATP. Com a conseqüència de la pujada del ratio ATP/ADP, els canals de K^+ ATP-dependents es tanquen i es dóna una despolarització de la membrana plasmàtica. Aleshores, els canals de Ca^{2+} s'obren i entren ions Ca^{2+} a la cèl·lula β . L'increment en la concentració de Ca^{2+} indueix la fusió dels grànuls d'insulina amb la membrana plasmàtica. (Figura adaptada de Pagliuca and Melton, 2013).

L'increment ràpid dels nivells de glucosa en sang comporta una resposta bifàsica en la secreció d'insulina. La primera fase té una important funció fisiològica d'eliminació ràpida de glucosa circulant la qual es dóna als pocs minuts (3-5 minuts) i correspon a l'exocitosi de la insulina acumulada en els grànuls de secreció dins de les cèl·lules β (Kahn, 2001). La segona fase d'alliberament d'insulina, més sostinguda i persistent durant un estadi d'hiperglucèmia, és deguda a la síntesi i posterior secreció d'insulina sintetitzada *de novo*.

1.3.3. Acció de la insulina a nivell sistèmic: homeòstasi de la glucosa

Els nivells de glucosa en sang es mantenen entre límits molt ajustats per mitjà del balanç entre la glucosa que entra a la circulació sistèmica (absorbida intestinalment després dels àpats o produïda principalment pel fetge) i la captació de glucosa en els teixits perifèrics, especialment el múscul esquelètic i el teixit adipós (Figura 4). La insulina i el glucagó són les principals hormones responsables del manteniment d'aquesta homeòstasi de la glucosa circulant.

En una situació de dejuni o d'elevada demanda de glucosa, el glucagó produït per les cèl·lules α del pàncrees manté els nivells de glucosa en sang constants per mitjà de la inducció de la glucogenòlisi i la gluconeogènesi en el fetge, que allibera glucosa al torrent sanguini. En canvi, quan la concentració de glucosa en sang augmenta, la insulina secretada per les cèl·lules β del pàncrees estimula la translocació del transportador GLUT-4, que permet que la glucosa sigui captada pel múscul, on s'acumula en forma de glicogen, i pel teixit adipós. La insulina, és el principal regulador del reservori d'energia en els adipòcits. Indueix l'acumulació de triglicèrids produïts a partir de la glucosa captada, i regula negativament la lipòlisi, encarregada d'alliberar àcids grassos al torrent circulatori que són utilitzats per altres teixits en situacions de demanda de combustible. El teixit adipós, a més, secreta adipoquines que serveixen d'indicadors de l'estat energètic de l'organisme. La senyalització de la insulina inhibeix també els processos de glucogenòlisi i gluconeogènesi en el fetge que deixa d'alliberar glucosa al torrent sanguini. Finalment, el cervell metabolitza gran part de la glucosa circulant, que és captada independentment de la insulina, i coordina tots aquests processos mitjançant senyals neuronals (Leto and Saltiel, 2012; Prentki and Madiraju, 2012).

Qualsevol alteració que afecti a la funcionalitat de les cèl·lules β pancreàtiques o al mecanisme d'acció de la insulina pot donar lloc a greus problemes metabòlics i al desenvolupament de diabetis mellitus.

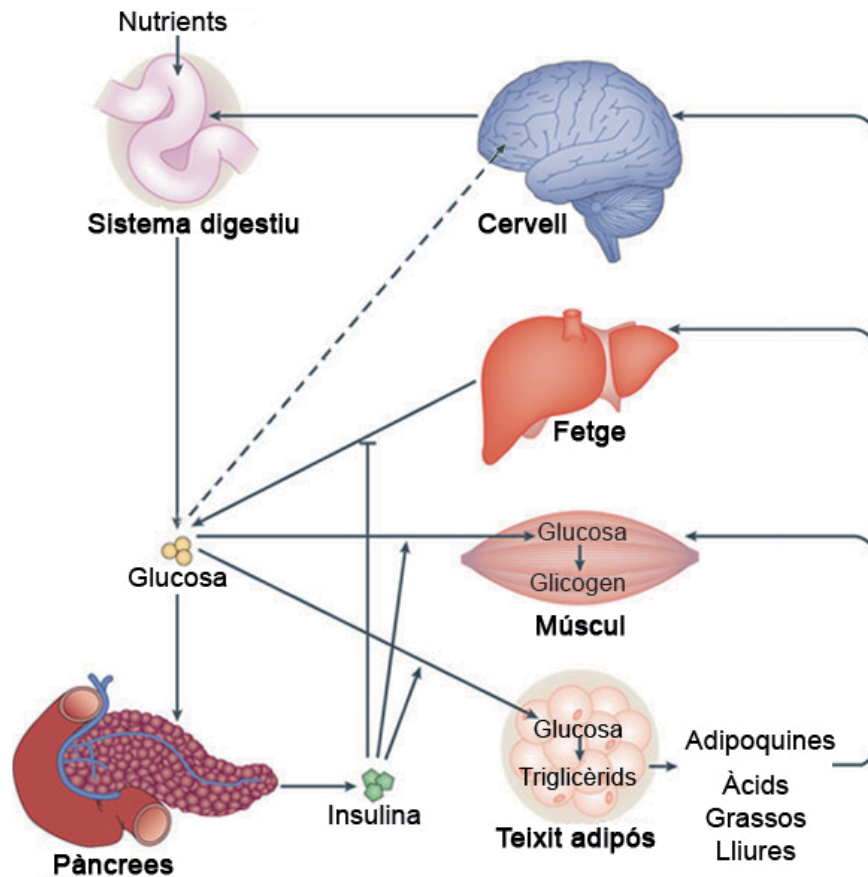


Figura 4. Acció de la insulina en l'homeòstasi de la glucosa. Quan els nivells de glucosa en sang augmenten després d'una ingesta de nutrients, les cèl·lules β del pàncrees secreten insulina, que estimula la captació de glucosa pels teixits perifèrics, principalment el múscul i el teixit adipós. Aquests teixits emmagatzemen la glucosa en forma de reservori de glicogen i de triglicèrids respectivament. A més, la senyalització de la insulina bloqueja la producció de glucosa al fetge, inhibint la glucogenòlisi i la gluconeogènesi. El cervell, en canvi, no depèn de la senyalització de la insulina per captar glucosa del torrent sanguini. No obstant, rep senyals de l'estat energètic de l'organisme per mitjà de les adipoquines secretades pel teixit adipós i actua coordinant tots aquets processos. (Figura adaptada de Leto and Saltiel, 2012).

1.4. Regulació de la massa de cèl·lula β

En circumstàncies normals, la població de cèl·lules β es manté en un rang òptim per a mantenir la demanda metabòlica. De fet, la massa de cèl·lules β no és estàtica sinó que té la plasticitat necessària per adaptar-se als canvis naturals de la càrrega metabòlica, com per l'exemple en estadis de residència a la insulina com l'embaràs i l'obesitat, i mantenir la normoglicèmia de l'organisme (Rhodes, 2005). La massa de cèl·lula β augmenta per processos de replicació, neogènesi (diferenciació a partir de cèl·lules precursors) i hipertròfia (augment de la mida de la cèl·lula). En contraposició, es dona una reducció de la massa de cèl·lula β a través de l'apoptosi, l'atròfia (reducció de la mida), la necrosi i autofàgia de les cèl·lules (Edinger and Thompson, 2004; Rhodes, 2005) (Figura 5).

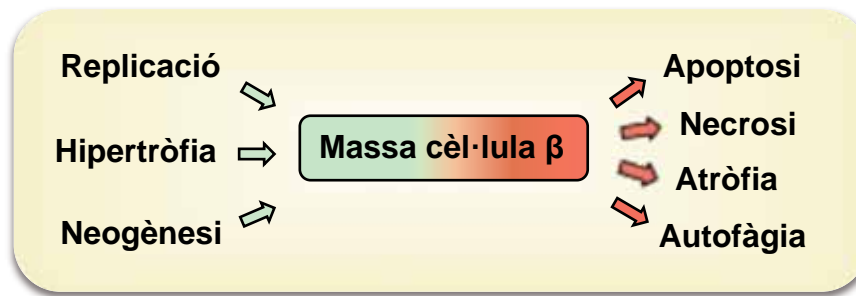


Figura 5. Regulació de la massa de cèl·lula β . Representació esquemàtica dels mecanismes que contribueixen en la regulació de la massa de cèl·lula β . La replicació, la hipertròfia i la neogènesi augmenten la massa de cèl·lula β , mentre que l'apoptosi, l'atròfia i l'autofàgia la disminueixen.

Durant l'embriogènesi i el creixement fetal, es produeix un increment net de la massa de cèl·lula β a mesura que l'individu creix. Aquesta expansió té lloc sobretot durant la fase final de la gestació i és deguda principalment a la diferenciació (neogènesi) i replicació de la cèl·lula β (Bouwens and Rooman, 2005). El desenvolupament fetal representa un període crític per a l'establiment d'un nombre apropiat de cèl·lules β . S'ha vist que si aquest procés no es dona correctament degut, per exemple, a retards en el creixement intrauterí o la malnutrició materna del fetus, es produeixen alteracions en la tolerància a la glucosa i la massa de cèl·lula β de la descendència (Garofano et al., 1997; Simmons et al., 2001).

A partir del naixement, la replicació i neogènesi de la cèl·lula β es redueix dràsticament. Està descrit en rosegadors que el creixement de la massa de cèl·lula β encara té lloc durant el període neonatal per mitjà d'aquests processos però de manera molt reduïda en comparació al creixement fetal (Kaung, 1994; McEvoy and Madson, 1980). Durant l'etapa adulta, es creu que la neogènesi ja no té lloc i l'expansió de la massa de cèl·lula β ocorre principalment mitjançant la duplicació de les cèl·lules β pre-existents (Dor et al., 2004; Georgia and Bhushan, 2004; Meier et al., 2008). Tot i així, la taxa de replicació d'una cèl·lula β adulta en condicions fisiològiques normals és molt baixa (Finegood et al., 1995; Teta et al., 2005).

1.4.1. Control de la replicació de la cèl·lula β : Cicle cel·lular.

La replicació és el procés principal per mitjà del qual augmenta la massa de cèl·lules β . Diferents factors de creixement i nutrients han mostrat estimular la proliferació de la cèl·lula β a varis nivells. Els més destacats són la glucosa, el factor de creixement similar a

la insulina tipus 1 (IGF-1), l'hormona de creixement, el factor de creixement dels hepatòcits (HGF), la prolactina i el lactogen de la placenta (Nielsen et al., 2001; Vasavada et al., 2006); però no està clar quins són els factors fisiològics que dirigeixen específicament la replicació de la cèl·lula β *in vivo*.

Es creu que les diferències de proliferació de la cèl·lula β es deuen a la capacitat de les pròpies cèl·lules a entrar al cicle cel·lular. El cicle cel·lular es divideix en diferents fases. La mitosi, o fase M, és el procés de divisió nuclear en què té lloc la condensació del contingut nuclear en cromosomes, per tal de repartir el material genètic entre les dues cèl·lules filles. La resta del cicle es coneix com interfase i se subdivideix en diferents parts: la fase S, la fase G_1 i la fase G_2 . Al llarg del cicle existeixen diferents punts de control, regulats per un conjunt d'activadors i inhibidors, que determinen si el procés es pot dur a terme exitosament. Entre els activadors del cicle, destaquen la família de les quinases dependents de ciclins, o Cdk, i les ciclins, que actuen formant complexos Cdk-ciclina. Per altra banda, existeixen inhibidors del cicle cel·lular, entre els quals es troben els inhibidors de les quinases dependents de ciclina (CIP ó KIP), i les proteïnes inhibidores de quinases (INK) que són de gran importància com a senyal negativa del creixement cel·lular (Figura 6).

En concret, es creu que les ciclins D1 i D2 i la proteïna CDK-4 són components reguladors essencials en el cicle cel·lular de la cèl·lula β (Cozar-Castellano et al., 2006a; Georgia et al., 2010; Heit et al., 2006). Ratolins deficientes en ciclina D2 presenten illots marcadament més petits i, en conseqüència, una massa de cèl·lula β deficient que els causa intolerància a la glucosa (Georgia and Bhushan, 2004; Kushner et al., 2005). De manera similar, ratolins deficientes en Cdk-4 no poden respondre a les demandes d'increment de la massa de cèl·lula β i esdevenen diabètics. En canvi, l'expressió d'una forma no regulada de Cdk-4 provoca hiperplàsia de la cèl·lula β i hipoglucèmia (Rane et al., 1999). A més a més, també s'ha descrit un paper important en el control de la replicació de la cèl·lula β per part dels reguladors CIP/KIP p27 i p21 que actuarien com a inhibidors del cicle cel·lular (Cozar-Castellano et al., 2006b; Georgia and Bhushan, 2006; Tsutsui et al., 1999). En models de diabetis tipus 2, s'ha demostrat que una disminució de p27 incrementa la proliferació de les cèl·lules β i que la sobreexpressió de p27 a la cèl·lula β porta a hipoplàsia dels illots i diabetis (Uchida et al., 2005). D'altra banda, illots deficientes en p21 presenten una replicació de la cèl·lula β incrementada en resposta a factors de creixement (Cozar-Castellano et al., 2006b).

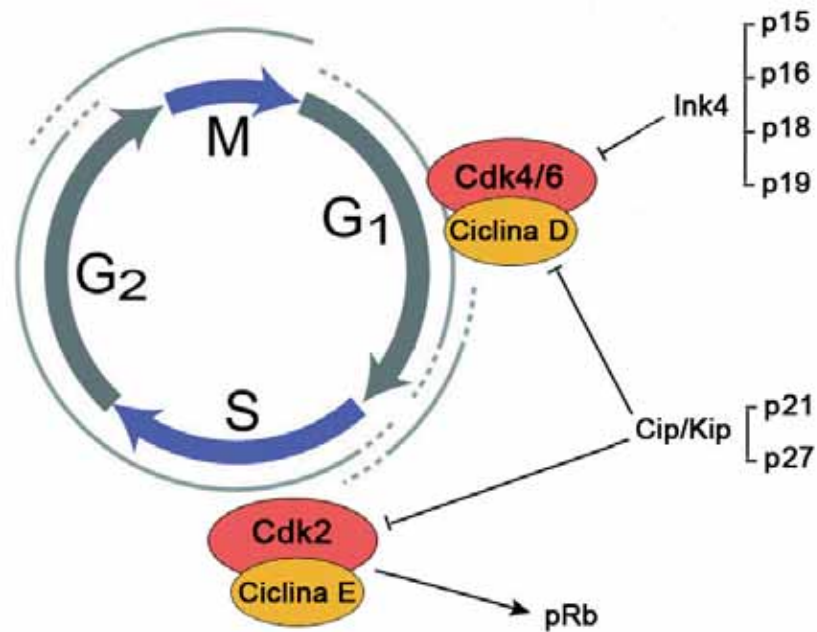


Figura 6. Representació esquemàtica de la progressió del cicle cel·lular entre les fases G₁ i S. En arribar un estímul pro-mitogènic a la cèl·lula, s'expressen les ciclins D que s'uneixen a Cdk-4 formant el complex actiu. A continuació, s'expressa la ciclina E que s'uneix a la Cdk-2 formant també el complex actiu. Els complexos Cdk/ciclina fosforilen la proteïna pRb, inactivant-la. Aquesta proteïna és el principal inhibidor de la progressió del cicle cel·lular de la fase G₁ a la S, per tant, la seva inactivació permet la replicació. Els estímuls pro-mitogènics també actuen disminuint l'activitat o l'expressió dels inhibidors dels complexos Cdk/ciclina com els INKs (p15, p16, p18, p19) o els CIP/KIP (p21, p27).

2. DIABETIS

La diabetis compren un grup de malalties metabòliques caracteritzades per la presència d'hiperglucèmia com a conseqüència dels defectes en la secreció d'insulina, en la seva acció, o bé d'ambdues. La hiperglucèmia crònica de la diabetis està associada a danys a llarg termini, com la disfunció i insuficiència de diversos òrgans, especialment els ulls, ronyons, nervis, cor i vasos sanguinis (American Diabetes Association, 2013).

Actualment es considera que existeixen en el món més de 380 milions d'individus diabètics i es preveu que aquest nombre es veurà incrementat fins a més de 590 milions l'any 2035 (Federació Internacional de Diabetis). La majoria dels casos de diabetis es poden classificar en dues àmplies categories: la diabetis tipus 1 i la diabetis tipus 2. La **diabetis tipus 1** és causada per la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β del pàncrees. En canvi, la **diabetis tipus 2** és causada per la resistència a la insulina en els teixits perifèrics (principalment en múscul, teixit adipós i fetge) i per la secreció inadequada de l'hormona insulina. Els defectes en la secreció de la insulina observada en la diabetis tipus 2 són probablement causats per la combinació tant de la disfunció cel·lular com de la reducció en la massa de cèl·lules β (Butler et al., 2003). Així doncs, tant en la diabetis tipus 1 com a la diabetis tipus 2, en última instància, es dona una insuficient massa funcional de la cèl·lula β .

A més de la diabetis tipus 1 i 2, la classificació actual de la malaltia inclou altres malalties amb menys prevalença com ara la **diabetis gestacional**, que es defineix com qualsevol grau d'intolerància a la glucosa amb inici o primer reconeixement durant l'embaràs; i altres tipus de diabetis causades per **defectes monogènics** que afecten a la funció de les cèl·lules β . Aquestes formes monogèniques de la diabetis es caracteritzen sovint per l'aparició d'hiperglucèmia a una edat primerenca (generalment abans dels 25 anys d'edat) i se'ls coneix com **MODY** (*Madurity Onset Diabetes of the Young*). Les MODY es caracteritzen per presentar defectes en la secreció d'insulina i cap o mínimes alteracions en l'acció de la insulina. Aquest grup de malalties s'hereten seguint un patró autosòmic dominant i s'han identificat fins a 14 *locis* genètics localitzats en diferents cromosomes. La forma més comú s'associa a mutacions en un factor de transcripció hepàtic, el factor nuclear d'hepatòcits (HNF)-1 α (MODY 3). Una segona forma està associada a mutacions en el gen de la glucoquinasa (MODY 2). Les formes menys comunes són el resultat de mutacions en altres factors de transcripció, com HNF-4 α , HNF-1 β , el factor promotor d'insulina (IPF-1) i NeuroD1 (American Diabetes Association, 2013).

2.1. Diabetis tipus 1

La diabetis tipus 1 (T1D) representa el 5-10% dels pacients diabètics i, en general, es desenvolupa durant la infància o adolescència dels individus, per la qual cosa també s'anomena diabetis juvenil, encara que pot iniciar-se a qualsevol edat (American Diabetes Association, 2013). La T1D és el resultat d'un atac autoimmunitari contra les cèl·lules β del pàncrees que les destrueix o les deteriora suficientment com per disminuir i eventualment eliminar la producció d'insulina (van Belle et al., 2011). L'absència de la senyalització d'insulina a nivell sistèmic redueix la captació i utilització de la glucosa pel fetge i pels teixits perifèrics, com el múscul i el teixit adipós, situació que condueix a la hiperglucèmia. A més, al fetge es perd la inhibició de les vies glucogenolítica i gluconeogènica, que continuen produint glucosa i empitjorant l'estat hiperglucèmic. D'altra banda, la manca d'insulina endògena causa una degradació significativa dels triglicèrids del teixit adipós i l'alliberació dels àcids grassos al torrent circulatori. Aquests àcids grassos alliberats són parcialment oxidats al fetge i convertits en cossos cetònics (acetoacetat, β -hidroxibutirat i acetona). Per tant, la manca d'insulina dóna lloc a la hiperglucèmia i la cetoacidosi, que pot acabar provocant un estat de coma i, en ocasions, la mort del pacient.

2.1.1. Patogènia de la diabetis tipus 1

Durant el procés autoimmunitari característic de la T1D, es poden diferenciar clarament dues etapes: una fase clínicament oculta caracteritzada per la generació d'autoanticossos dirigits contra una àmplia gamma d'antígens de les cèl·lules β i una progressiva infiltració de limfòcits T autoreactius i altres cèl·lules inflamatòries en els illots anomenada insulinitis (Figura 7A-E); i una fase de diabetis oberta on es fa extensa la destrucció de les cèl·lules β provocant així una deficiència en la producció de insulina i, finalment, la hiperglucèmia (Figura 7F) (Chen et al., 2005). El període de temps entre l'aparició de biomarcadors de la T1D i l'inici dels símptomes clínics és molt variable i poden passar diversos anys fins que es produeix la malaltia clínica (Harrison, 2001). No és fins que es produeix una pèrdua del 70-80% de la massa de cèl·lula β que té lloc l'aparició de valors elevats de glucosa en sang i es diagnostica la T1D.

En alguns casos es pot detectar una fase temporal anomenada *Honeymoon* on les cèl·lules β restants compensen la hiperglucèmia a través d'un augment en la seva proliferació i un increment en la secreció dels nivells d'insulina. Finalment, aquestes cèl·lules no tindran prou capacitat i acabaran morint, donant lloc així a una hiperglucèmia crònica (Figura 7) (van Belle et al., 2011; Zhou and Jensen, 2013).

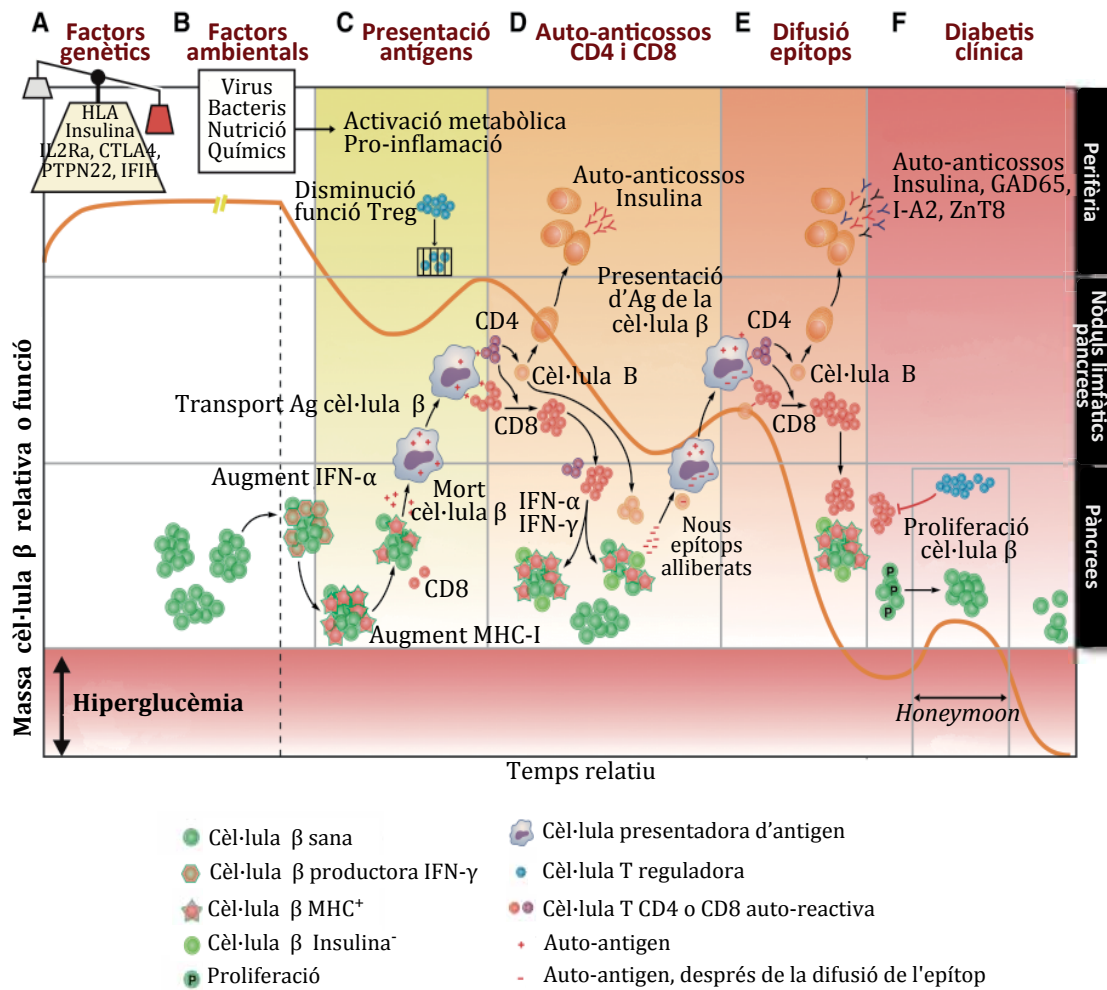


Figura 7. Patogènia de la diabetis tipus 1. Representació esquemàtica de les diferents fases immunològiques (columnes a la part superior) i els llocs anatòmics rellevants on es produeixen (files a la dreta) de la T1D. Quan la massa o funció de les cèl·lules β (representat per la línia taronja) cau fins a valors ubicats en la franja vermella l'individu és diagnosticat clínicament amb T1D. Treg: limfòcits T reguladors; Ag: antigen; IFN-α/γ: interferó α/γ; MHC-I: complex major d'histocompatibilitat I. (Adaptat de van Belle et al., 2011).

2.1.2. Característiques generals de la resposta immunitària

La resposta immunitària es divideix en dos tipus principals: la immunitat natural (o innata), i la immunitat adquirida (o específica). La immunitat natural constitueix la primera línia de defensa i inclou les barreres físiques, el sistema del complement, les cèl·lules fagocítiques (macròfags i neutròfils) i les cèl·lules NK (*natural killers*). Tots aquests mecanismes de defensa estan presents abans de l'atac d'un patògen i, a més, no diferencien entre la majoria de substàncies estranyes. Aquest tipus de resposta és ràpida i és la primera en intervenir enfront d'un patògen.

En canvi, la resposta adquirida reconeix específicament els antígens i és capaç d'amplificar-se amb cada exposició. Inclou principalment, limfòcits (T i B) i anticossos, però també té la capacitat de reclutar cèl·lules de la resposta innata, com per exemple els macròfags. Existeixen dos tipus principals de resposta immunitària adquirida o específica:

1) *Resposta mediada per anticossos (humoral o Th2)*

Els anticossos o immunoglobulines circulen per la sang i els diferents fluids de l'organisme i s'uneixen específicament a l'antigen que els ha induït. La unió dels anticossos amb l'antigen, per una banda, els inactiva i impedeix que s'uneixin als receptors cel·lulars i, per l'altra banda, serveix com a marcatge, facilitant la seva fagocitació o destrucció per sistema del complement. Les cèl·lules productores d'anticossos són els limfòcits B. També hi participen els limfòcits T CD4⁺ (*helper* o col·laboradors) que secreten citokines que ajuden a l'activació dels limfòcits B. En aquest tipus de resposta, es diu que les cèl·lules T CD4⁺ i les citokines secretades són de tipus Th2 (IL-4, IL-10, TGF- β , etc.) i tenen propietats immunomoduladores o anti-inflamatòries.

2) *Resposta mediada per cèl·lules (cel·lular o Th1):*

Implica la producció de cèl·lules que reaccionen contra els antígens presentats a la superfície de les cèl·lules de l'hoste. Aquestes cèl·lules són els limfòcits T CD8⁺ o citotòxics que reconeixen els antígens presentats i induïxen la mort de la cèl·lula diana. En aquest tipus de resposta també hi col·laboren els limfòcits T CD4⁺ de tipus Th1 que reconeixen els antígens de la membrana de cèl·lules de l'hoste i actuen secretant senyals químiques (citokines) per activar macròfags i potenciar l'activació de limfòcits T CD8⁺. El tipus de citokines secretades en una resposta Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α , etc.) són de caràcter pro-inflamatori.

Les respostes del sistema immune adquirit no s'inicien al lloc on es troba l'antigen primari si no que tenen lloc en els teixits limfàtics perifèrics. Els antígens són capturats per cèl·lules especialitzades, anomenades cèl·lules presentadores d'antigen (APC), que els processen i transporten al nòdul limfàtic més pròxim, on són presentats als limfòcits T. La presentació dels antígens a les cèl·lules T té lloc mitjançant la unió a complexes majors d'histocompatibilitat o MHC de tipus I i II. L'expressió del MHC de classe II (MHC-II) es restringeix normalment a les cèl·lules presentadores d'antígens (APC) del sistema immunitari, com poden ser macròfags, cèl·lules dendrítiques, limfòcits B i limfòcits T. Són reconegudes per les cèl·lules T CD4⁺ i donen lloc a la seva posterior activació. En canvi, el

MHC de classe I (MHC-I) s'expressa a totes les cèl·lules nucleades de l'organisme i és reconegut pel receptor TCR de les cèl·lules CD8+ citotòxiques (Abbas et al., 2007).

A més de la senyal proporcionada pel reconeixement específic de l'antigen presentat pel MHC amb el TCR, cal una segona senyal estimuladora per a l'activació del limfòcit T. Aquesta senyal és de caràcter no específic i és proporcionada per la unió d'un lligand B7 (B7.1/CD80 ó B7.2/CD86), en la cèl·lula presentadora d'antigen, amb el seu receptor CD28, en la cèl·lula T. Si ambdues senyals són presents, la cèl·lula T prolifera i secreta citoquines (Greenfield et al., 1998) (Figura 8).

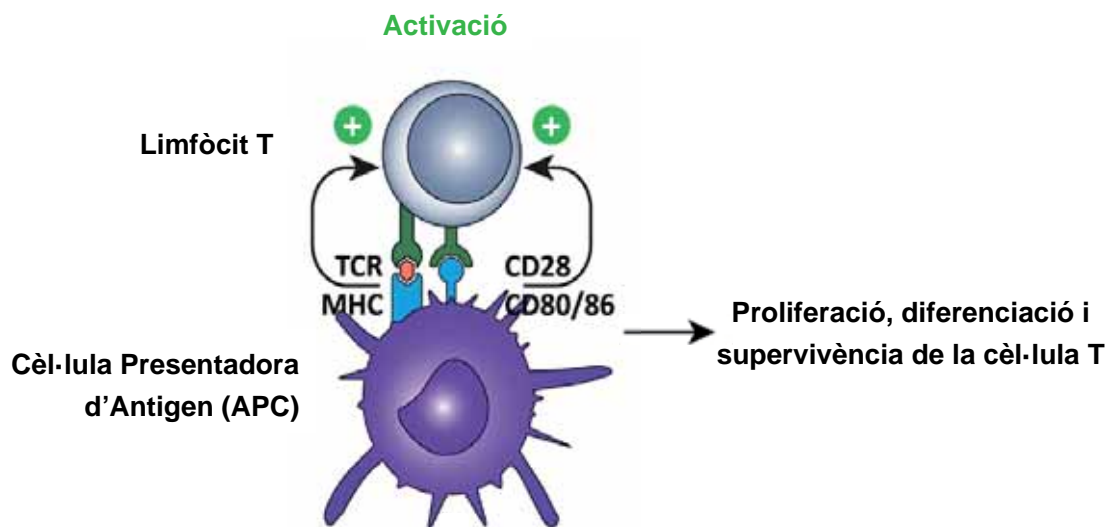


Figura 8. Activació del limfòcit T. Després del reconeixement del complex MHC:antigen pel TCR, la segona senyal per a l'activació de la cèl·lula T és proporcionada per la unió de CD80 (B7.1) ó CD86 (B7.2) en la cèl·lula presentadora d'antigen amb el co-receptor CD28 en la superfície del limfòcit T (Adaptat de Vasaturo et al., 2013).

2.1.3. Mecanisme de l'atac autoimmune contra les cèl·lules β

El mecanisme exacte de com funciona l'atac autoimmune contra les cèl·lules β , així com la seva activació són qüestions que encara no és coneixen amb detall. S'han identificat *locus* genètics (MHC-II i altres) que podrien predisposar a l'aparició de l'atac autoimmune contra la cèl·lula β . No obstant, factors ambientals com les infeccions víriques, toxines, o components de la dieta, podrien estar involucrats en la manifestació clínica de la susceptibilitat genètica.

Una vegada desenvolupada l'autoimmunitat específica contra la cèl·lula β , s'inicia la infiltració limfocítica dels illots, o insulitis. La insulitis està formada principalment per

limfòcits T CD8⁺ i CD4⁺, però també s'hi troben macròfags, cèl·lules dendrítiques i alguns limfòcits B. Es creu que la resposta autoimmunitària contra les cèl·lules β és principalment una resposta de tipus Th1 (Bradley et al., 1999; Mathis et al., 2001). No obstant, també s'observen components humorals de la resposta amb presència de nivells circulants d'auto-anticossos contra antígens de la cèl·lula β , com la insulina (IAA) o l'àcid glutàmic descarboxilasa (GAD) (Atkinson and Eisenbarth, 2001). No està clar si aquests autoanticossos poden participar en la inducció de la malaltia o si, en canvi, són el resultat del dany induït per les cèl·lules T citotòxiques i de la consegüent alliberació d'antígens. Tanmateix, la detecció d'aquests autoanticossos contra antígens de la cèl·lula β permet predir l'aparició de T1D (Knip et al., 2002).

Els autoantígens de la cèl·lula β són processats per macròfags, cèl·lules dendrítiques o cèl·lules B en l'illot pancreàtic i presentades a limfòcits T CD4⁺ autoreactius en els nòduls limfàtics dels pàncrees. Aquestes cèl·lules T CD4⁺ autoreactives són activades i secreten citokines, que al seu torn poden activar limfòcits T CD8⁺ citotòxics específics de la cèl·lula β . Les cèl·lules T activades són reclutades als illots pancreàtics i produeixen més citokines que també activen macròfags i altres cèl·lules T, contribuint a la destrucció dels illots. Així, la mort de la cèl·lula β durant el curs de la insulitis és causada pel contacte directe amb les cèl·lules T o macròfags activats, i/o l'exposició als mediadors solubles secretats per aquests cèl·lules, incloent citokines (IL-1 β , TNF α i IFN- γ , MCP-1, etc.), òxid nítric (NO) i radicals lliures d'oxigen. Aquests factors activen una cascada de senyals intracel·lulars que condueixen a l'apoptosi de la cèl·lula β (Chandra et al., 2001; Cnop et al., 2005; Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Mauricio and Mandrup-Poulsen, 1998; Yoon and Jun, 2005) (Figura 9).

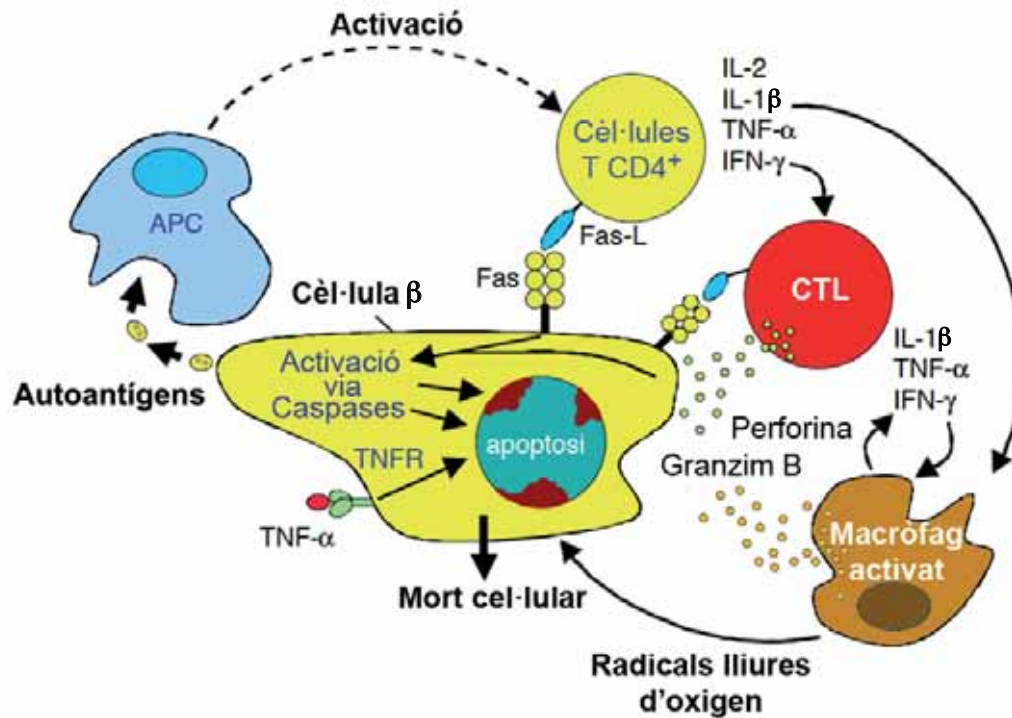


Figura 9. Mecanismes de destrucció de la cèl·lula β a la diabetis tipus 1. La infiltració limfocítica dels illots es caracteritza principalment per la presència de cèl·lules presentadores d'antigen (APC), com macròfags i cèl·lules dendrítiques, cèl·lules T $CD4^+$ i $CD8^+$. La destrucció cel·lular protagonitzada per les cèl·lules T està mediada per l'alliberament de molècules citotòxiques, com determinades citoquines, granzim B o perforina, o per comunicació directa de senyals de mort cel·lular per mitjà de la via Fas. (Adaptat de Kawasaki et al., 2004).

2.1.4. Control dels mecanismes de tolerància i autoimmunitat per les cèl·lules T reguladores

Probablement existeixen de manera natural en l'organisme cèl·lules T autoreactives contra antígens de la cèl·lula β , però estan restringides per mitjà de mecanismes immunoreguladors induïnt l'estat de tolerància contra aquests autoantígens (Moudgil and Sercarz, 2000). La diabetis tipus 1 es desenvolupa quan algun d'aquests mecanismes falla, i permet l'activació dels limfòcits T autoreactius, desencadenant el procés inflamatori als illots que culmina amb la destrucció de la cèl·lula β . Es desconeixen els mecanismes que inicien el trencament de la tolerància immune en la T1D.

En els últims anys s'han multiplicat les evidències que apunten al paper de les cèl·lules T reguladores (Treg) com a mecanisme central de la regulació immune. Es creu que la funció de les Tregs és suprimir les cèl·lules T efectores (Teff) i limitar l'expansió de les respostes immunes actives per a prevenir el dany als teixits de l'organisme. Existeixen dos tipus de Treg que difereixen en la seva especificitat i mecanisme efector: les Treg naturals, i les Treg induïdes o adquirides (Bluestone and Abbas, 2003). Les Treg naturals

es desenvolupen en el timus durant les primeres fases del desenvolupament fetal o neonatal de les cèl·lules T i reconeixen diversos antígens propis. Un cop generades, són exportades als teixits perifèrics on actuen prevenint l'activació d'altres cèl·lules T autoreactives. En canvi, les Treg induïdes són generades a partir de poblacions madures de cèl·lules T que es diferencien a Treg sota determinades condicions. Normalment, l'activació d'aquestes cèl·lules té lloc als teixits limfàtics secundaris però també pot ocórrer al teixit inflamat. Es desconeixen les condicions que estimulen la formació d'aquestes cèl·lules. Probablement estigui determinada per factors extrínsecs, com citoquines supressives, presentació inapropiada d'antígens (absència de co-estimulació), o contactes cèl·lula-cèl·lula amb Treg naturals.

En general les Treg són cèl·lules CD4⁺ que expressen nivells variables de CD25 i el factor de transcripció Foxp3 (Fontenot et al., 2005). Les Treg exerceixen la seva activitat supressora mitjançant dos mecanismes centrals: a) la producció de citoquines inhibidores (IL-10, TGF- β) i b) l'establiment d'interaccions directes cèl·lula-cèl·lula amb les cèl·lules Teff.

Diverses malalties autoimmunes, incloent la T1D, s'han relacionat amb una deficiència en el nombre o funcionalitat de les Treg (Chen et al., 2005; Jäger and Kuchroo, 2010; Kukreja et al., 2002; Roep and Tree, 2014), fet que podria venir determinat per una susceptibilitat genètica. Quan es produeix un desequilibri entre les cèl·lules Teff que reconeixen autoantígens de la cèl·lula β i les Treg encarregades de mantenir l'estat de tolerància, apareix la diabetis tipus 1 (Feurerer et al., 2009) (Figura 10).

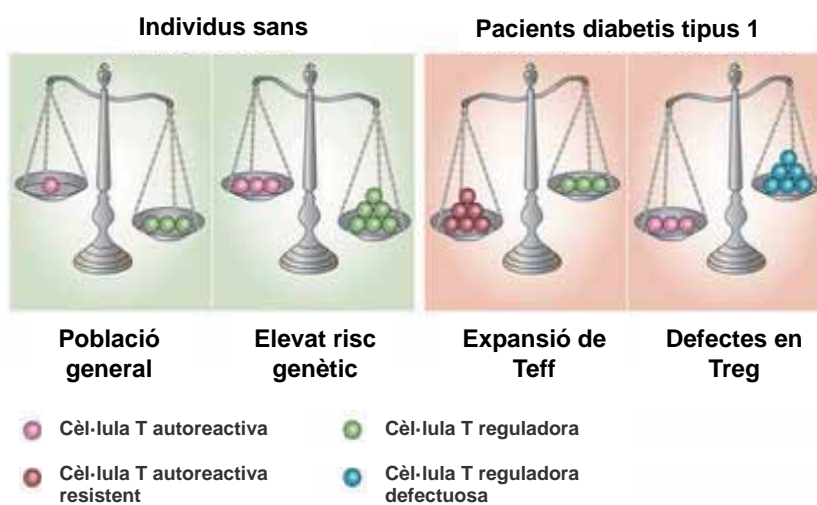


Figura10. Desequilibris entre la regulació immune i l'autoimmunitat. La diabetis tipus 1 és el resultat de la destrucció autoimmune de les cèl·lules β pancreàtiques en individus que presenten alteracions en la regulació de sistema immune. En alguns casos això és degut a factors de predisposició genètica. (Adaptat de Roep and Tree, 2014).

2.2. Tractaments actuals per a la diabetis tipus 1

Els tractaments actuals per a pacients amb diabetis tipus 1 inclouen teràpies de reemplaçament d'insulina convencional per injecció de l'hormona o mitjançant l'ús de bombes que alliberen insulina per reduir la glucosa en sang. No obstant, aquests tractaments no prevenen el desenvolupament de complicacions secundàries a llarg termini derivades de la hiperglucèmia crònica. A més, els pacients estan exposats a episodis d'hipoglucèmia, potencialment mortals, ja que no s'arriba a assolir el sofisticat nivell de regulació fisiològic. Per tal de superar aquests inconvenients, s'ha posat molta cura en la millora de sistemes tancats, anomenats "pàncrees artificials" (Keenan et al., 2010), on un sensor col·locat subcutàniament contínuament mesura els nivells de glucosa en sang i, a través d'una bomba d'insulina amb una agulla fina implantada sota la pell, allibera la hormona necessària (Dolgin, 2012).

El transplantament de pàncrees o d'illots són possibles aproximacions terapèutiques per a la T1D ja que proporcionen una font endògena d'insulina fisiològicament regulada. No obstant, l'escassetat de donants, el rebuig immunològic i la necessitat de la immunosupressió fa que aquestes teràpies estiguin limitades (Jahansouz et al., 2011).

Per altra banda, donada la etiologia de la T1D, existeixen teràpies basades en immunomoduladors els quals retardarien l'inici de la diabetis tipus 1 i/o protegirien a les cèl·lules β residuals de l'atac autoimmune per així mantenir la producció d'insulina endògena. Els primers tractaments d'aquest tipus van mostrar una eficàcia limitada però s'està treballant en noves aproximacions. Per exemple, existeixen anticossos anti-CD3 els quals redueixen el nombre de limfòcits T circulants en el pacient. Tot i això, els assaigs clínics en fase III d'aquests anticossos monoclonals no van obtenir els objectius inicials esperats (Sherry et al., 2011; Waldron-Lynch and Herold, 2011). Un altre anticòs anti-CD20, contra els limfòcits B, està essent provat en individus diabètics (Waldron-Lynch and Herold, 2011). Després d'un any del tractament amb anti-CD20 els pacients presentaven una millor funcionalitat de la cèl·lula β i necessitaven una menor dosi d'insulina respecte als controls durant els primers 6 mesos, però posteriorment els individus tractats acabaven perdent la massa de cèl·lula β (Lysy et al., 2012; Waldron-Lynch and Herold, 2011).

Un altre camp en desenvolupament és l'estudi de les cèl·lules mare embrionàries (ESC, *Embryonic Stem Cells*) i les cèl·lules pluripotencials induïdes (iPS), les quals a partir

de diferents estratègies es poden diferenciar o reprogramar en cèl·lules productores d'insulina i, en un futur, podrien esdevenir una teràpia cel·lular per a la diabetis tipus 1. Actualment, s'han aconseguit reprogramar fibroblasts adults provinents de pacients diabètics inserint només tres factors de transcripció, Oct-4, Sox2 i Klf4 (Maehr et al., 2009), els quals poden ésser derivats a cèl·lules productores d'insulina (Pagliuca and Melton, 2013). Hi ha múltiples grups que estan avançant cap a la diferenciació de ESC i de iPS cap a cèl·lules Pdx1⁺ capaces de produir insulina o secretar pèptid C (Soria et al., 2000; Thatava et al., 2013; Zhang et al., 2009). No obstant, el repte més important en la reprogramació cel·lular és aconseguir una bona diferenciació de les cèl·lules β de forma que puguin produir la insulina d'una manera finament regulada. A més, encara falten estudis per avaluar els riscos immunes del transplantament de cèl·lules derivades de ESC o iPS.

2.3. Models animals de la diabetis tipus 1

L'estudi de la patogènesi de la diabetis en humans és complicat degut a diversos factors: 1) l'òrgan diana, el pàncrees, és anatòmicament poc accessible, 2) la seva manipulació pot comportar problemes greus (per exemple pancreatitis), 3) els processos que precedeixen l'inici clínic de la malaltia són asimptomàtics i poden durar des de mesos fins a anys i 4) els processos patològics tenen lloc localment en els illots i no es reflecteixen a nivell perifèric. Per tot això, la utilització de models animals en l'estudi de la T1D ha estat molt important per poder examinar els mecanismes involucrats en el desenvolupament d'aquesta malaltia.

Existeixen models murins que desenvolupen diabetis de manera espontània, com són per exemple les rates BB (*BioBreeding Worcester*) o els ratolins NOD (*Non-Obese Diabetic*), i han estat de particular importància en l'estudi de la T1D. La utilització, a més, d'animals transgènics, i de models de diabetis induïts experimentalment (per exemple, mitjançant el tractament amb Streptozotocina) han permès posar en marxa noves vies d'estudi.

2.3.1. Models induïts experimentalment

2.3.1.1 Models induïts amb agents químics

Existeixen diversos agents químics amb propietats diabetogèniques com l'estreptozotocina (STZ) i l'al·loxan. Ambdós tòxics són específics de la cèl·lula β i la seva

efectivitat com agents diabetogènics depèn en gran part de l'edat, sexe i espècie a la qual s'administren. Aquests agents han permès estudiar detalladament els fenòmens bioquímics, hormonals i morfològics que tenen lloc durant i després de la inducció de l'estat diabètic.

L'estreptozotocina (STZ), 2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)1-D-glucopiranososa, és un antibiòtic d'ampli espectre produït pel microorganisme *Streptomyces achromogenes*. La STZ és capaç d'entrar a les cèl·lules β a través del receptor GLUT-2, donada la seva similitud estructural amb la molècula de glucosa (Schneidl et al., 1994). La inducció de la mort de les cèl·lules β per aquest tòxic ve donada per diferents mecanismes: 1) danys a la membrana plasmàtica, 2) trencament de les cadenes de DNA, 3) processos de metilació, 4) generació de radicals lliures, i 5) producció d'òxid nítric (NO) (Wilson et al., 1984). El protocol d'administració de la STZ en determina el mecanisme d'acció. Així, l'administració d'una única dosi intraperitoneal d'elevada concentració de STZ (150 mg/kg) provoca la destrucció ràpida de les cèl·lules β per acció citotòxica directa, donant una pèrdua del 90% del contingut pancreàtic d'insulina i, per tant, induint hiperglucèmia. Alternativament, es poden administrar múltiples dosis a baixa concentració de STZ (5x40-50 mg/kg en dies consecutius). Aquest mètode es coneix com *multiple low dose streptozotocin* o MLDSTZ. En aquest cas, es redueix l'efecte citotòxic directe de la STZ, però s'indueix una resposta inflamatòria contra les cèl·lules β , amb infiltració limfocitària (insulitis) (Rossini et al., 1977).

2.3.1.2 Models d'animals transgènics

Amb l'objectiu d'estudiar el paper de diferents elements del sistema immune en el desenvolupament de la diabetis, s'han generat animals transgènics que sobreexpressen citoquines, antígens del MHC, i altres antígens específicament a les cèl·lules β dels illots sota el control del promotor del gen de la insulina de rata (RIP).

A) Animals transgènics que expressen antígens del MHC a les cèl·lules β .

La detecció d'expressió ectòpica d'antígens del MHC-II a les cèl·lules β de pacients diabètics humans i en el ratolí diabètic espontani NOD, va portar a la generació de ratolins transgènics que expressaven el MHC-II a les cel·lules β (Adorini et al., 2002; Böhme et al., 1989; Foulis, 1986; Hanafusa et al., 1987; Lo et al., 1988; Sarvetnick et al., 1988). En conjunt, aquets estudis semblen indicar que hi ha un llindar d'expressió del MHC-II a les cèl·lules β per sobre del qual es desenvolupa la T1D (Allison et al., 1990). De manera

similar, ratolins transgènics que sobreexpressen molècules del MHC-I a les cèl·lules β pancreàtiques també desenvolupen diabetis (Allison et al., 1988).

B) Animals transgènics que expressen citoquines a les cèl·lules β .

La generació d'animals transgènics que expressen citoquines ha contribuït en l'estudi del paper d'aquestes molècules en la patogènesi de la T1D. En conjunt, s'ha suggerit un que les citoquines IFN- α , IFN- γ i IL-2 i tenen un paper patogènic en el desenvolupament de T1D; mentre que IL-4, IL-6 i TGF- β podrien tenir un paper protector (Rabinovitch and Suarez-Pinzon, 2003).

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

2.3.2. Models espontanis de diabetis

Els ratolí NOD (*Non-Obese Diabetic*) representen el principal model d'estudi de la malaltia. Aquest model murí es caracteritza per desenvolupar una diabetis sense obesitat, que és molt similar a la diabetis tipus 1 humana. (*Veure apartat 3*).

3. EL RATOLÍ NOD: *Non-Obese Diabetic*

3.1. Descripció del model

El model de ratolí NOD (*Non-Obese Diabetic*) va ser descrit per primera vegada al Japó per Makino S. *et al.* com un model de diabetis mellitus espontània que presentava la destrucció autoimmune dels illots pancreàtics característica de la diabetis tipus 1 en humans. Es va aïllar a partir d'una sublínia de ratolins JC1-ICR seleccionats en funció de l'aparició espontània de diabetis i la capacitat reproductiva (Makino et al., 1980).

La incidència de diabetis en la soca NOD presenta una marcada diferència en funció del sexe. A les 30 setmanes d'edat, la incidència acumulada d'individus diabètics és del 60-80% en les femelles i del 20-30% en els mascles NOD (Anderson and Bluestone, 2005). L'aparició de diabetis ocorre de manera abrupta en ambdós sexes, i normalment s'inicia a partir de les 12-14 setmanes d'edat, tot i que es pot produir en edats més avançades. S'ha descrit que la incidència de diabetis en els ratolins NOD varia d'una colònia a una altra, depenent de l'entorn i possiblement de la deriva genètica del *stock* original. Per exemple, la incidència és major en colònies que es mantenen en instal·lacions lliures de patògens (SPF) (Jayasimhan et al., 2014).

Els símptomes diabètics es caracteritzen bioquímicament per poliúria, polidípsia, hiperglucèmia, glucosúria i hipercolesterolèmia acompanyats per una ràpida pèrdua de pes corporal. En cap cas no s'observa remissió de la malaltia. No obstant, l'administració diària d'insulina indueix un augment del pes corporal i prolonga la vida dels ratolins diabètics (Makino et al., 1980). L'examen patològic dels pàncreas dels animals NOD mostra una elevada freqüència d'infiltració de limfòcits en els illots de Langerhans. La insulitis és present en ambdós sexes fins i tot en estadis pre-diabètics (a partir de les 5 setmanes) i progressa amb l'edat (Figura 11).

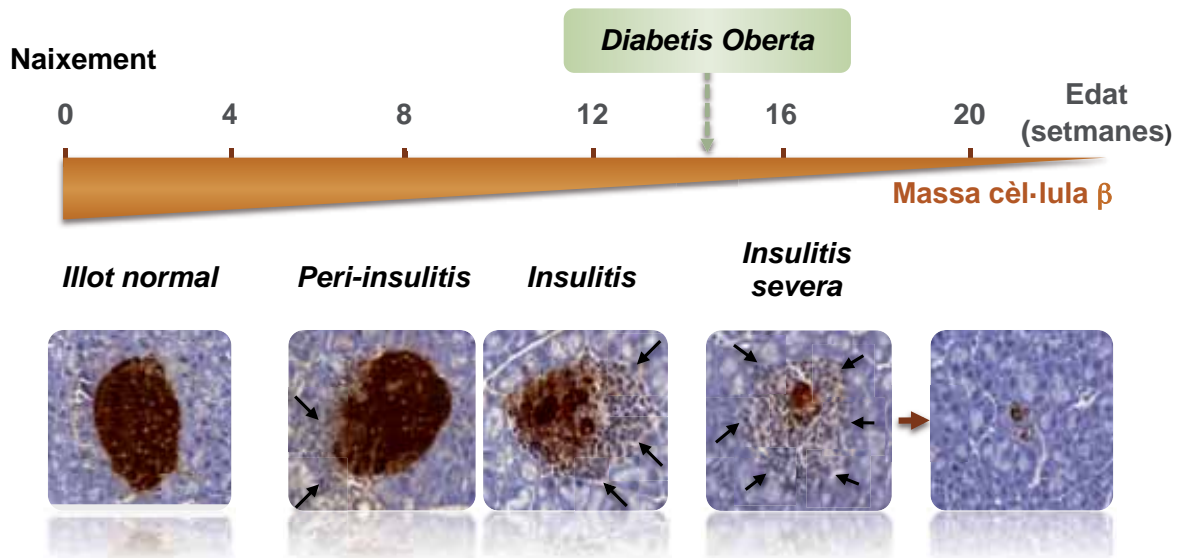


Figura11. Aparició cronològica dels esdeveniments immunes i canvis en la massa de cèl·lula β que culminen en l'aparició de T1D en els animals NOD. Es poden distingir diferents estadis inflamatoris previs a la manifestació clínica de diabetis. En el moment de néixer els illots tenen una aparença normal (0-4 setmanes). A les 5 setmanes apareix l'infiltrat mononuclear en els illots (peri-insulitis) que avança progressivament fins a envair el core del illot (insulitis). A partir de les 12 setmanes la insulitis passa a una fase destructiva (insulitis severa) que coincideix amb l'aparició de diabetis. En els individus diabètics la massa de cèl·lula β és pràcticament inexistent i es produeix una regressió de la insulitis. Les fletxes negres senyalen els limfòcits infiltrants a les imatges.

3.2. Susceptibilitat genètica: defectes en el sistema immune

Múltiples *loci* controlen la susceptibilitat genètica al desenvolupament de diabetis en el ratolí NOD. Aquests ratolins presenten un haplotip únic pel MHC, anomenat H-2^{g7}, que constitueix la principal contribució genètica a la susceptibilitat de la malaltia (Tisch and McDevitt, 1996; Wicker et al., 1995). Aquest haplotip del MHC presenta un seguit de defectes que alteren substancialment el repertori de pèptids que poden unir-se i ser presentats pel MHC codificat en aquest al·lel (Kanagawa et al., 1998). Sorprenentment, una alteració genètica similar també s'observa en el *loci* de susceptibilitat genètica a T1D del MHC en humans (Todd et al., 1987). A més del locus del MHC, molts altres *loci* contribueixen al desenvolupament de la malaltia i s'anomenen locus *Idd*. Més de 40 locus *Idd* diferents han estat identificats (Anderson and Bluestone, 2005; Burren et al., 2011; Driver et al., 2011; Todd and Wicker, 2001), però en molts casos, es desconeixen amb exactitud els elements estructurals o reguladors que hi ha codificats.

Tot i que en molts casos es desconeixin els *loci* genètics associats, se sap que el ratolí NOD presenta un seguit d'alteracions en elements del sistema immune que contribueixen a l'aparició d'autoimmunitat. La majoria d'estudis se centren en el paper de les cèl·lules T

en el desenvolupament i progressió de la malaltia, tot i que el sistema immune dels ratolins NOD és defectuós per a diferents subconjunts de leucòcits. Entre ells destaca una maduració i funció de macròfags deficient (Serreze et al., 1993), nivells baixos d'activitat de les cèl·lules NK (Kataoka et al., 1983; Ogasawara et al., 2003), i deficiències en la població de cèl·lules T reguladores CD4⁺CD25⁺ (Salomon et al., 2000). De fet, altres desordres autoimmunes endocrins com sialitis (infiltració de les glàndules salivals) (Hu et al., 1992), adrenalitis (Beales et al., 2002) i tiroïditis (Many et al., 1996) també es donen en els ratolins NOD.

3.3 Caracterització de la insulitis

En el ratolí NOD, cèl·lules presentadors d'antígens contra l'illot apareixen en primer lloc als nòduls limfàtics pancreàtics (PLNs) a les 2-4 setmanes d'edat (Turley et al., 2003). Les cèl·lules T efectores presents en els nòduls són activades i comença el procés d'autoimmunitat contra els illots. A les 4-6 setmanes d'edat es pot observar una acumulació peri-vascular i peri-ductal de limfòcits i finalment a les 6-8 setmanes apareix la infiltració al perímetre dels illots (peri-insulitis) (Jansen et al., 1994; Papaccio et al., 1994; Rosmalen et al., 2002). En primer terme, es destrueixen les neurones i cèl·lules de Schwann que envolten l'illot (Kaufman et al., 1993; Saravia and Homo-Delarche, 2003; Winer et al., 2003). Les cèl·lules T sintetitzen citocines, particularment IFN- γ , i propaguen la reacció autoimmune que intensifica la destrucció d'aquestes cèl·lules fins que es formen ruptures en la membrana basal de l'illot. Això permet a l'infiltrat monocuclear penetrar a l'interior de l'illot (insulitis) i començar l'atac a les cèl·lules endocrines. Els limfòcits infiltrants destrueixen específicament les cèl·lules β productores d'insulina (Figura 12).

Les cèl·lules mononuclears presents en l'infiltrat de l'illot en el ratolí NOD, igual que en humans, són CD4⁺ i CD8⁺ autoreactives (cèl·lules dendrítiques, macròfags, NK, limfòcits B). En les primeres fases de l'activació de la resposta autoimmune predominen els macròfags i les cèl·lules dendrítiques. Durant la peri-insulitis els illots estan infiltrats per cèl·lules majoritàriament CD4⁺ i les cèl·lules CD8⁺ són reclutades en un estadi posterior, quan l'infiltrat mononuclear penetra l'interior del illot (Jansen et al., 1994; Varey et al., 1991). La inflamació produïda per tot aquest procés culmina amb la destrucció progressiva de les cèl·lules β . Quan la massa de cèl·lula β destruïda assoleix valors al voltant del 80% es produeix la manifestació clínica de diabetis. En aquest estadi, els illots es caracteritzen per haver perdut completament el seu component de cèl·lules β i per la regressió de la insulitis.

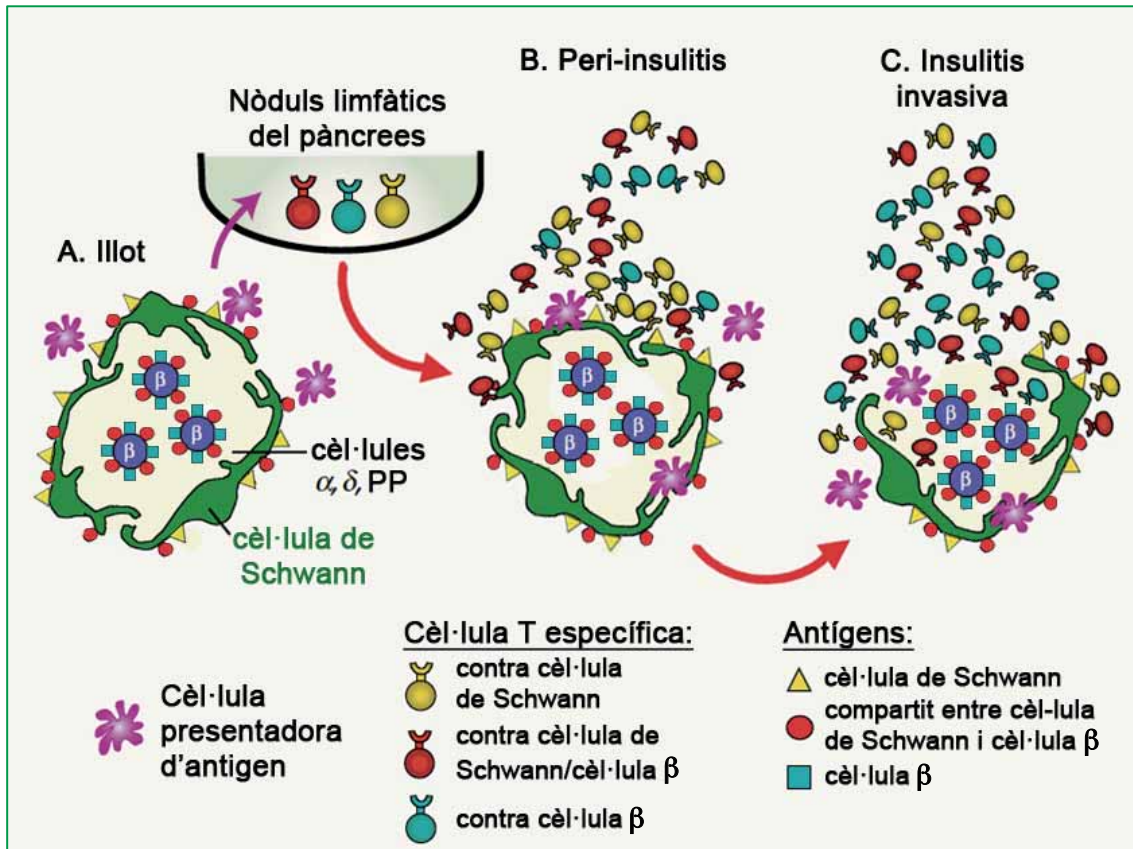


Figura 12. Model d'inici de la progressió a diabetis tipus 1 en el ratolí NOD. (A) L'apoptosi de les cèl·lules β , o de les cèl·lules de Schwann perifèriques, o d'ambdues, condueix a la captació d'antígens per part de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) i a l'activació de les cèl·lules T en els nòduls limfàtics pancreàtics. (B) Les cèl·lules immunes activades s'acumulen al voltant dels illots en estreta relació amb les cèl·lules de Schwann (peri-insulitis). Aquesta primera onada de resposta autoimmunitària està dirigida probablement contra antígens de les cèl·lules de Schwann (groc; per exemple GFAP), antígens de la cèl·lula β (blau; per exemple insulina) o d'ambdós. Donat que tant les cèl·lules β com les cèl·lules de Schwann expressen algunes proteïnes en comú (vermell; per exemple GAD), la resposta autoimmunitària contra un dels dos tipus cel·lulars podria afectar l'altre. (C) Les cèl·lules immunes envaeixen l'illot i l'autoimmunitat contra antígens de la cèl·lula β continua propagant-se (insulitis invasiva). (Adaptat de Kaufman, 2003).

4. FACTOR DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA-1 (IGF-1)

Els factors de creixement similars a la insulina (IGFs), són proteïnes implicades en el creixement normal i, especialment, en el desenvolupament fetal de la massa de cèl·lules β del pàncrees (Lingohr et al., 2002). Existeixen dos membres que pertanyen a aquesta família de proteïnes: el factor de creixement similar a la insulina tipus 1 (IGF-1) i el factor de creixement similar a la insulina tipus 2 (IGF-2). Els IGFs comparteixen un elevat grau d'homologia entre ells i amb la insulina (Daughaday and Rotwein, 1989). Aquests factors inicien un nombre de vies relacionades amb la diferenciació i maduració cel·lular (Lingohr et al., 2002; Withers, 2000). En concret, el factor IGF-1 és un dels principals mediadors del creixement tan pre-natal com post-natal (Randhawa and Cohen, 2005; Rosenfeld, 2006) i s'ha demostrat que té un paper important en el desenvolupament del pàncrees ja que estimula la diferenciació i proliferació de les cèl·lules β (Le Roith, 1997).

4.1. Patró d'expressió i regulació del factor IGF-1

Estudis en models de rosegadors han determinat que, durant el desenvolupament embrionari, el mRNA d'*Igf-1* s'expressa de manera ubiqua en la majoria de teixits. No obstant, a partir del naixement els nivells d'expressió d'*Igf-1* cauen i queden principalment restringits al fetge, que representa el teixit més important de síntesi i producció del factor IGF-1 circulant (Lund et al., 1986; Murphy et al., 1987). Els nivells plasmàtics d'IGF-1 augmenten ràpidament després del naixement fins a la pubertat, de manera correlacionada amb la velocitat de creixement. Un cop assolida l'etapa adulta es mantenen relativament constants. Existeixen diferents estímuls tròfics que indueixen l'expressió d'IGF-1. El més destacat és la senyalització produïda per la hormona de creixement (GH) al fetge, però també altres factors com l'estat nutricional, els estrògens, o factors del desenvolupament que controlen l'organogènesi (Emler and Schalch, 1987; Murphy and Friesen, 1988; Randhawa and Cohen, 2005; Le Roith, 1997; Rotwein et al., 1987).

Les accions d'IGF-1 tenen efectes pleiotròpics i estan controlades per diferents mecanismes. L'IGF-1 pot unir-se al seu propi receptor (IGF-1R) i, amb menys afinitat, al receptor de la insulina (IR) (Nakae et al., 2001; Zapf et al., 1978). Mentre la insulina actua principalment sobre el fetge, el múscul i el teixit adipós regulant el metabolisme i l'homeòstasi de glucosa, l'acció de l'IGF-1 té lloc a tot l'organisme (Daughaday and Rotwein, 1989; Kahn, 1985). Aquestes diferències són degudes bàsicament a la diferent distribució dels respectius receptors ja que tant la insulina com l'IGF-1 estimulen la mateixa via de senyalització. Així, els teixits implicats en la captació i metabolització de la

glucosa, com el fetge, el múscul esquelètic i el teixit adipós, tenen molts IR i pocs IGF-1R, mentre que, per exemple, les cèl·lules β dels illots pancreàtics presenten sobretot receptors d'IGF-1 (Van Schravendijk et al., 1987). Ambdós receptors formen part d'una família de receptors tirosina-quinasa anomenats receptors tipus I, formats per quatre subunitats que s'estructuren en dímers. Els receptors de la insulina poden estar formats per dos isoformes diferents (IR-A, IR-B) i els receptors d'IGF-1 poden estar formats per les dues isoformes del IR i pel IGF-1R que només té una isoforma. La combinació de dímers que formen el receptor determina la diferent afinitat de lligand (Figura 13).

Un altre nivell de regulació està format per les proteïnes d'unió als IGFs (IGFBPs). Hi ha 6 proteïnes d'unió que modulen l'acció dels IGFs anomenades IGFBP-1 a 6. Les IGFBPs s'uneixen als IGFs en circulació i limiten la seva disponibilitat perquè puguin interaccionar o no amb els receptors dels IGFs. A més, també controlen directament l'acció dels IGFs (Collett-Solberg and Cohen, 2000).

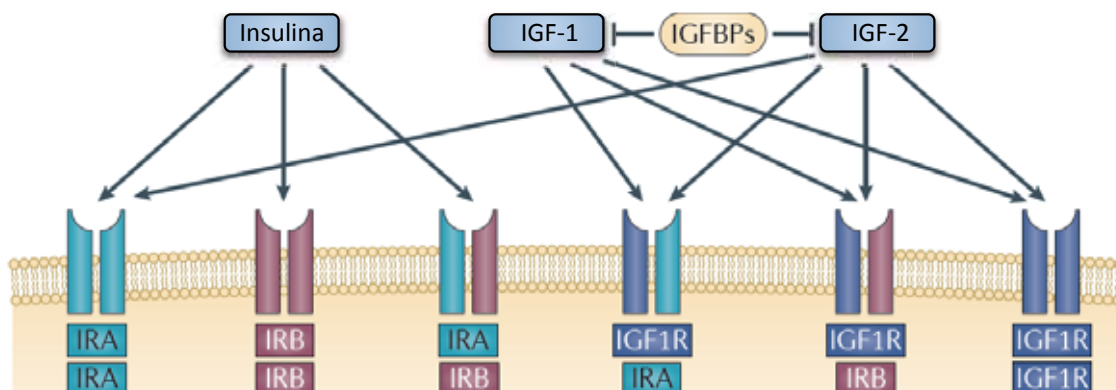


Figura 13. Família de receptors de la insulina i d'IGF-1. Les isoformes A i B del receptor de la insulina (IRA, IRB) i el receptor del factor IGF-1 (IGF1R) es combinen formant dímers que configuren sis espècies diferents de receptors. Les fletxes indiquen la diferent afinitat de lligand en funció del dímer que formi el receptor (Adaptat de Pollak, 2012).

4.2. Cascada de senyalització del factor IGF-1 a les cèl·lules β

L'IGF-1 és el factor de creixement més rellevant i millor caracteritzat que controla la proliferació i supervivència de la massa de cèl·lula β (Rhodes and White, 2002). Fins i tot altres factors de creixement importants per la cèl·lula β , com el pèptid similar al glucagó tipus 1 (GLP-1), es creu que actuen induint l'expressió d'IGF-1R (Cornu et al., 2009, 2010).

A part del paper d'IGF-1 durant el desenvolupament embrionari, s'ha vist que l'IGF-1 també té funcions importants en la regulació de la massa de cèl·lula β durant l'etapa post-natal. Per exemple, s'ha observat que els nivells d'IGF-1 augmenten durant l'increment de massa de cèl·lula β que té lloc en l'obesitat per fer front a la resistència perifèrica a la insulina (Frystyk et al., 1999), o en resposta a pancreatectomies parcials induïdes en gossos i rates (Hayakawa et al., 1996; Smith et al., 1991). Tanmateix encara existeixen discrepàncies pel que fa a la capacitat d'IGF-1 d'incrementar la massa de la cèl·lula β (Liu, 2007). De fet, la inactivació del seu receptor IGF-1R específicament a la cèl·lula β porta a intolerància a la glucosa però no modifica la massa de cèl·lula β (Kulkarni et al., 2002). Fins i tot, la inactivació del gen de l'IGF-1 a les cèl·lules β pancreàtiques no només no disminueix la massa de cèl·lula β , sinó que indueix hiperplàsia dels illots (Lu et al., 2004).

D'altra banda, les propietats antiapoptòtiques i anti-inflamatòries del factor IGF-1 han estat àmpliament demostrades. Així, en diversos estudis, s'ha comprovat que en illots cultivats amb citoquines pro-inflamatòries com IL-1 β , TNF- α , o IFN- γ , l'IGF-1 proporciona una protecció contra l'apoptosi dels illots i contra la inhibició de la secreció d'insulina induïda per les citoquines (Castrillo et al., 2000; Giannoukakis et al., 2000; Harrison et al., 1998; Mabley et al., 1997). El mateix passa quan es cultiven illots obtinguts d'animals NOD pre-diabètics amb IGF-1 (Hill et al., 1999).

La unió del lligand IGF-1 amb el seu receptor indueix un canvi conformacional que incrementa l'activitat tirosina-quinasa del receptor IGF-1R. El primer pas de la via de senyalització és la fosforilació de les proteïnes anomenades IRSs (substractes del receptor de la insulina) (White, 2002). En particular, es considera que la senyalització promoguda per la fosforilació d'IRS-2 és la principal encarregada d'induir els efectes anti-apoptòtics i proliferatius d'IGF-1 (Withers et al., 1999).

La capacitat proliferativa d'IGF-1 està mediada principalment per la via de senyalització de les proteïnes quinases activades per mitògens (MAPK). En concret, la cascada de senyalització d'IRS-2 indueix la fosforilació de les quinases regulades per senyals extracel·lulars-1 i -2 (Erk-1 i -2), membres de la família de les MAPK. Això fa que siguin translocades al nucli on indueixen la transcripció de gens de proliferació i fosforilen altres factors de transcripció (Lingohr et al., 2002) (Figura 14).

Per altra banda, l'IRS-2 promou l'activació de la fosfo-inositol-3-quinasa (PI3K) que al seu torn activa la proteïna quinasa B (PKB) o AKT (Holst et al., 1998). L'activació d'AKT es

correlaciona amb l'efecte anti-apoptòtic d'IGF-1 que actua a diferents nivells (Chen et al., 2004; Kauffmann-Zeh et al., 1997; Kooijman, 2006). Una de les dianes primàries de l'AKT és la proteïna BAD (proteïna promotora de mort associada a Bcl-2). Quan BAD és fosforilada per Akt deixa d'interaccionar amb les proteïnes Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) o Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) que poden exercir la seva funció anti-apoptòtica. La proteïna AKT també indueix la fosforilació de la procaspasa-9, inhibint així la seva activació proteolítica i bloquejant la cascada d'inducció de mort per apoptosi mediada per casapases. A més, l'AKT disminueix l'expressió de receptors inductors de mort, com el lligand Fas (FasL), reduint també l'apoptosi mediada per Fas. D'altra banda, l'activació d'Akt condueix a l'expressió del factor de transcripció NF-KappaB (NF-κB) que entra al nucli de la cèl·lula i activa la transcripció d'altres gens anti-apoptòtics (Figura 14).

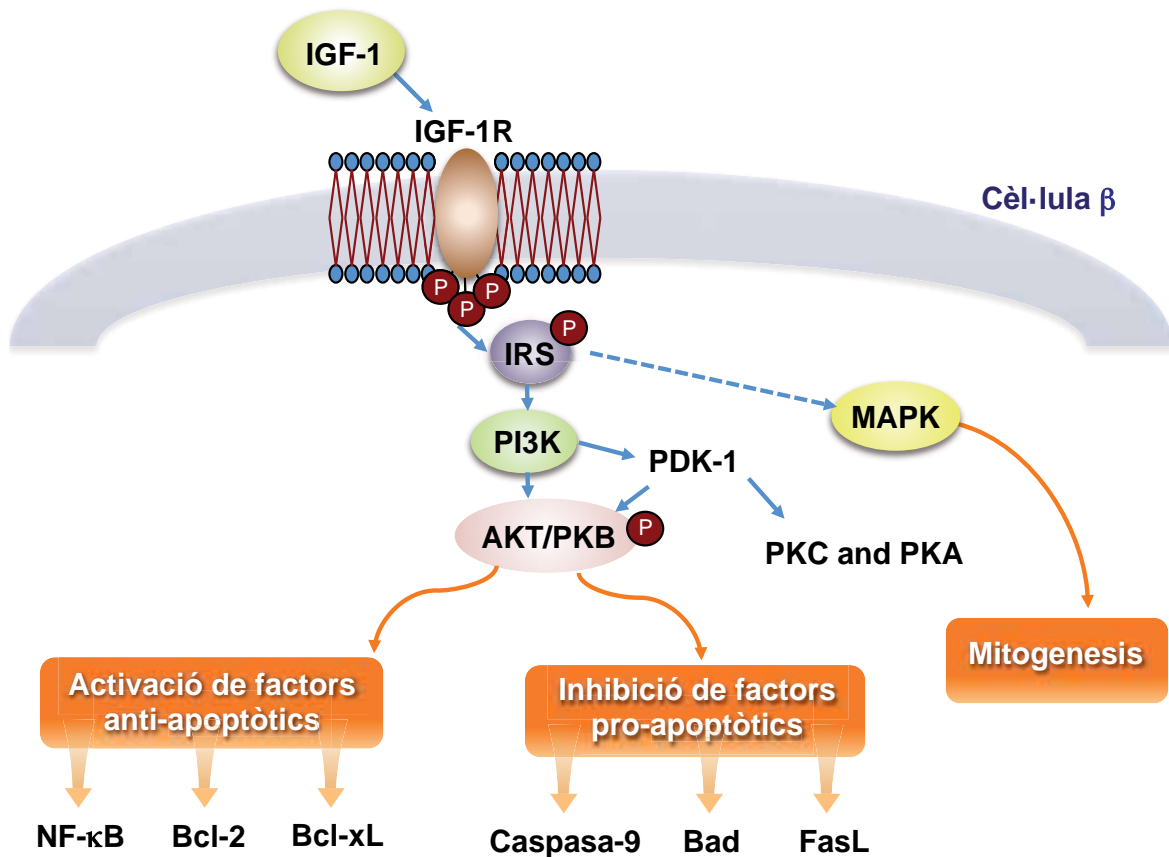


Figura 14. Via de senyalització del factor IGF-1 a la cèl·lula β. L'activació del receptor de l'IGF-1 (IGF-1R) per unió al seu lligand (IGF-1) activa una cascada de fosforilacions a l'interior de la cèl·lula β que condueixen a l'activació de dues vies principals: la via de les MAPK, que estimula la proliferació, i la via de la l'AKT, que senyalitza l'efecte anti-apoptòtic d'IGF-1.

4.3. IGF-1 i prevenció de diabetis

4.3.1. Teràpies amb proteïna IGF-1 recombinant

Defectes en la senyalització de la insulina estan associats a diabetis. En la T2D, l'alteració de la sensibilitat perifèrica a la insulina provoca un estat de resistència a la senyalització de la insulina i una secreció inadequada de l'hormona. D'altra banda, en la T1D, alteracions en la senyalització de la insulina estan associades als canvis que es produeixen durant el desenvolupament com la pubertat o l'embaràs, o a un control metabòlic deficient. Donat que l'IGF-1 i la insulina comparteixen la mateixa via de senyalització cel·lular, el factor IGF-1 ha estat emprat per al tractament de la diabetis mostrant beneficis molt clars (Savage et al., 2004). L'administració intravenosa de proteïna IGF-1 recombinant en pacients amb una marcada resistència a la insulina produeix efectes similars a la insulina, millorant el control glicèmic i altres paràmetres metabòlics. No obstant, l'increment en els nivells circulants d'IGF-1 comportava el desenvolupament efectes secundaris no desitjats (Jabri et al., 1994).

D'altra banda, es va observar que l'administració subcutània diària de proteïna IGF-1 recombinant en ratolins NOD pre-diabètics, reduïa la severitat de la insulitis en els illots i la incidència de T1D (Bergerot et al., 1995; Kaino et al., 1996). A més, l'administració d'IGF-1, sol o en complex amb la IGFBP-3, protegia els illots de la insulitis i retardava l'aparició de T1D en el ratolí NOD. En aquests estudis, el complex IGF1/IGFBP-3 va ser més efectiu que l'IGF-1 individualment, probablement degut a l'increment de la vida mitja d'IGF-1 en el complex (Chen et al., 2004). De manera similar, la transferència de cèl·lules T autoreactives a ratolins NOD tractats amb IGF-1 redueix la incidència de diabetis degut a una reducció de la insulitis i alteracions en l'activació de cèl·lules T del sistema immune (Bergerot et al., 1996). Finalment, en un estudi realitzat al nostre laboratori es va observar que l'expressió d'IGF-1 a les cèl·lules no parenquimals del fetge era capaç de preservar la massa de cèl·lula β i prevenir el desenvolupament de diabetis autoimmune en ratolins transgènics per IFN- β tractats amb STZ. Aquesta prevenció, a més, era deguda a un increment de les cèl·lules T reguladores al pàncrees dels ratolins (Anguela et al., 2013).

Així doncs, els efectes d'IGF-1 sobre la cèl·lula β i sobre la modulació del sistema immune podrien tenir un paper molt important en la supervivència dels illots en front d'un atac autoimmune.

4.3.2. Animals transgènics que expressen IGF-1 en les cèl·lules β

Per tal d'estudiar els efectes locals de la producció d'IGF-1 sobre la cèl·lula β , en el nostre laboratori es van generar animals transgènics que sobreexpressen IGF-1 murí específicament en les cèl·lules β pancreàtiques sota el control del promotor del gen de la insulina-1 de rata (RIP-1) tant en el fons genètic C57Bl/6-SJL com CD1 (Agudo et al., 2008; George et al., 2002). Es va estudiar si la sobreexpressió d'IGF-1 era capaç de contrarestar els efectes de la inducció de la diabetis experimental mitjançant el tractament amb STZ. Es va observar que, després del tractament amb STZ, els ratolins control esdevenien diabètics i morien. En canvi, els animals transgènics que sobreexpressaven IGF-1, presentaven hiperglucèmia i hipoinsulinèmia després del tractament, però amb el temps eren capaços de normalitzar aquests paràmetres metabòlics i sobreviure. Això era degut a una reducció de l'apoptosi i un increment de la replicació de les cèl·lules β .

Posteriorment, es va demostrar que la sobreexpressió d'IGF-1 era, a més, capaç de contrarestar una diabetis autoimmune. Per això, es van creuar els ratolins RIP-1/IGF-1 amb ratolins transgènics RIP-1/IFN- β , també generats al nostre laboratori. Els ratolins RIP-1/IFN- β sobreexpressen IFN- β humà als illots, i mostren insulitis i una major susceptibilitat a desenvolupar diabetis que fa que esdevinguin diabètics amb l'administració de dosis de STZ no diabetogèniques per a ratolins control (Pelegrin et al., 1998). En els dobles transgènics IGF-1/IFN- β , es va observar una disminució de la insulitis i de l'apoptosi de la cèl·lula β que bloquejava la pèrdua de massa de cèl·lules β (Casellas et al., 2006). Així, en aquest model IGF-1 tenia un clar efecte anti-inflamatori i antiapoptòtic.

Per tant, aquests resultats indiquen que l'expressió local d'IGF-1 a les cèl·lules β del pàncrees, contraresta la diabetis tipus 1 en un model de diabetis induïda experimentalment amb STZ; i en el model transgènic de diabetis tipus 1 RIP-1/IFN- β quan és administrat amb dosis no diabetogèniques de STZ. No obstant, seria de gran interès caracteritzar si l'expressió local d'IGF-1 a les cèl·lules β del pàncrees també és capaç de prevenir o contrarestar la diabetis tipus 1 en un model d'aparició espontània de la malaltia com el model NOD.

En conjunt, aquests antecedents indicarien que la transferència gènica d'*Igf-1* a pàncrees podria ser una possible estratègia terapèutica per la diabetis tipus 1.

5. TERÀPIA GÈNICA

Tot i que els tractaments existents tant en la diabetis tipus 1 com en la diabetis tipus 2 han millorat significativament la qualitat de vida dels pacients, aquestes teràpies presenten certs inconvenients i no aconsegueixen curar la malaltia. Per això, cal desenvolupar noves teràpies preventives o curatives per la T1D. En aquest sentit, les aproximacions de teràpia gènica dirigides al pàncrees podrien oferir un nou ventall d'oportunitats per al futur desenvolupament de nous tractaments per la diabetis.

5.1. Introducció a la teràpia gènica

La teràpia gènica ha estat redefinida actualment com una estratègia basada en la transferència de material genètic exogen (DNA o RNA) a les cèl·lules o teixits diana amb finalitats terapèutiques. El material genètic exogen pot ser introduït per afegir nous gens o incrementar la dosi gènica d'un gen (DelloRusso et al., 2002), per corregir gens defectuosos (Haurigot et al., 2013; Li et al., 2011; Miller et al., 2006), o fins i tot per silenciar l'expressió gènica de determinats gens (Aoki et al.), amb la finalitat de corregir o alleujar els símptomes d'una malaltia (Heilbronn and Weger, 2010).

La teràpia gènica es pot dividir en dos subtipus: la **teràpia gènica *ex vivo***, on les cèl·lules del teixit diana s'obtenen per mitjà d'una biòpsia, es cultiven i modifiquen genèticament *in vitro*, i finalment es transfereixen de nou al pacient; i la **teràpia gènica *in vivo***, on les cèl·lules són modificades genèticament *in situ* en l'individu (Anderson, 1998).

Un dels factors clau en l'èxit de la teràpia gènica és el desenvolupament de vehicles de transferència gènica, anomenats **vectors**, que siguin eficients, segurs i innocus a l'hora de transferir el material genètic al teixit o teixits diana. En els últims anys s'ha desenvolupat una àmplia gama de vectors amb l'objectiu d'aconseguir aquesta finalitat. En general aquests vectors es classifiquen en dos grans categories: els vectors no virals i els vectors virals. Els sistemes de transferència basats en **vectors no virals** inclouen la injecció directa de DNA mitjançant mètodes físics (electroporació, sonicació), o bé, l'encapsidació del DNA amb liposomes (lípidis catiónics o polímers catiónics) per introduir el material genètic a la cèl·lula diana. Els **vectors virals** exploten la capacitat infectiva natural dels virus per entrar a la cèl·lula, transferir el material genètic al nucli i expressar les proteïnes o el RNA que codifiquen.

5.2. Vectors virals

Els virus són vehicles naturals altament evolucionats per a la transferència de material genètic exogen a les cèl·lules infectades. Aquests atributs els ha portat a ser objecte de nombroses modificacions genètiques per tal de fer possible i optimitzar el seu ús en la teràpia gènica. Els vectors virals són virus modificats per tal que no puguin induir una infecció productiva. En aquest cas, la càpside viral conté un genoma genèticament modificat que conserva la capacitat infectiva natural i permet la introducció del material genètic al nucli de la cèl·lula diana (procés conegut com transducció), però és incapaç d'induir la producció de nous virions. L'eliminació dels gens propis del genoma natural del virus que no dirigeixen la transducció, s'aprofita per a generar una major capacitat de clonatge del constructe terapèutic i disminuir la possible resposta del sistema immune de l'hoste contra el vector (Kay et al., 2001).

En la Taula 1 es presenta un resum de les principals característiques dels vectors virals més comunament utilitzats en la teràpia gènica.

Taula 1. Característiques generals dels vectors virals.

Vector	Avantatges	Desavantatges
Adenovirus (Ad)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada capacitat de clonatge (36 kb) ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ Roman episomal ▪ Útils en experiments de curta durada 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Provoca resposta inflamatòria degut a la capacitat immunològica ▪ Tropisme inespecífic ▪ Alta toxicitat hepàtica
Virus adenoassociats (AAV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ Roman episomal ▪ Producció amb elevats títols ▪ Baixa immunogenicitat ▪ No patogènic ▪ Àmplia varietat de serotips amb diferents tropismes específics de teixits ▪ Elevada estabilitat en línies cel·lulars 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixa capacitat de clonatge (4.8 kb)
Retrovirus (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expressió estable en cèl·lules en divisió ▪ Producció amb elevats títols ▪ Possible re-administració 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Integració a l'atzar al genoma de l'hoste amb el risc de mutagènesi insercional ▪ Capacitat de clonatge (8 kb) ▪ Infecta només cèl·lules en divisió
Lentivirus (LV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ Expressió estable a llarg termini ▪ No immunogènic 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Integració a l'atzar al genoma de l'hoste amb el risc de mutagènesi insercional ▪ Es necessiten més estudis per avaluar la manca de patogenicitat

(Adaptació de Kay, 2011; Verma and Weitzman, 2005).

5.3. Vectors virals adeno-associats (AAV)

Els vectors virals basats en els virus adeno-associats (AAV) són vehicles molt eficients per a la teràpia gènica. Un grup important de dades procedents d'estudis en models d'experimentació animal han demostrat la baixa immunogenicitat i absència de patogenicitat dels AAV. Aquests vectors presenten un perfil de seguretat excel·lent i l'habilitat de proporcionar una expressió a llarg termini en una gran varietat de teixits (Mount et al., 2002). A més, fins ara cap procés patogènic ha estat associat als AAV en humans. És per això que la majoria d'estratègies terapèutiques per a tractar malalties genètiques en humans per mitjà de la teràpia gènica *in vivo* estant fent ús de la tecnologia dels AAV amb resultats molt prometedors (Mingozzi and High, 2011). Recentment, ha estat aprovat el primer producte de teràpia gènica basat en AAVs a Europa (Glybera) (Ylä-Herttuala, 2012).

5.3.1. Biologia dels virus AAV

Els virus AAV pertanyen al gènere Dependovirus de la família *Parvoviridae*. Aquesta classificació es basa en el fet que els AAV depenen de la coinfecció d'un virus *helper* no

relacionat (per exemple un adenovirus, el virus de l'herpes, el citomegalovirus humà o el virus del papil·loma) per a una infecció productiva. Fins a l'actualitat, 14 serotips diferents i més de 100 variants han estat descrits, aïllats com a contaminants de les preparacions adenovirals o a partir de les seqüències provirals que s'han trobat integrades en primats no humans i teixits humans (Büning et al., 2008). Tot i això, només uns quants s'han utilitzat com a vectors i han estat estudiats amb més profunditat (Kay, 2011). Tots els serotips dels AAV presenten una estructura, mida del genoma, i organització similar, essent el AAV5 el serotip més divergent (Qiu and Pintel, 2004). La gran variabilitat de serotips està determinada per la presència de proteïnes diferents en la càpside viral que resulta en l'ús de diferents receptors i co-receptors de superfície cel·lular per a l'entrada a la cèl·lula. Aquest fet, en combinació amb les alternatives de processament intracel·lular, genera un tropisme tissular concret per a cada serotip. Per exemple, els AAV8 tenen tropisme pel fetge; els AAV1, AAV6 i AAV7 pel múscul esquelètic i els AAV9 pel cor (Büning et al., 2008).

Els AAV contenen un genoma de DNA monocadena d'aproximadament 5 kb, el qual és empaquetat en una càpside icosaèdrica sense envolta de 20-25 nm de diàmetre. En el genoma dels AAV es poden identificar tres regions funcionals importants: dues pautes de lectura obertes (ORF) anomenades *rep* i *cap* i les repeticions terminals invertides (ITR) (Carter and Samulski, 2000) (Figura 15).

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

El ORF *rep* codifica per quatre proteïnes multifuncionals (REP) implicades en la replicació del genoma viral, el control de la transcripció, la integració i l'encapsidació dels genomes dels AAV en càpsides preformades. Els virus AAV salvatges presenten certa tendència a integrar-se en una regió específica del cromosoma 19 humà anomenada AAV-S1 (Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991).

El ORF *cap* codifica per a tres proteïnes de la càpside: VP1, VP2 i VP3, les quals tenen en comú la major part de la seqüència d'aminoàcids excepte l'extrem N-terminal. Les diferències en les proteïnes de la càpside dels diferents serotips dels AAV resulten en l'ús de diferents receptors de superfície per tal d'entrar a la cèl·lula diana. Aquestes

diferències, en combinació amb el processament intracel·lular alternatiu, determina les diferències de tropisme de cada serotip dels AAV (Büning et al., 2008).

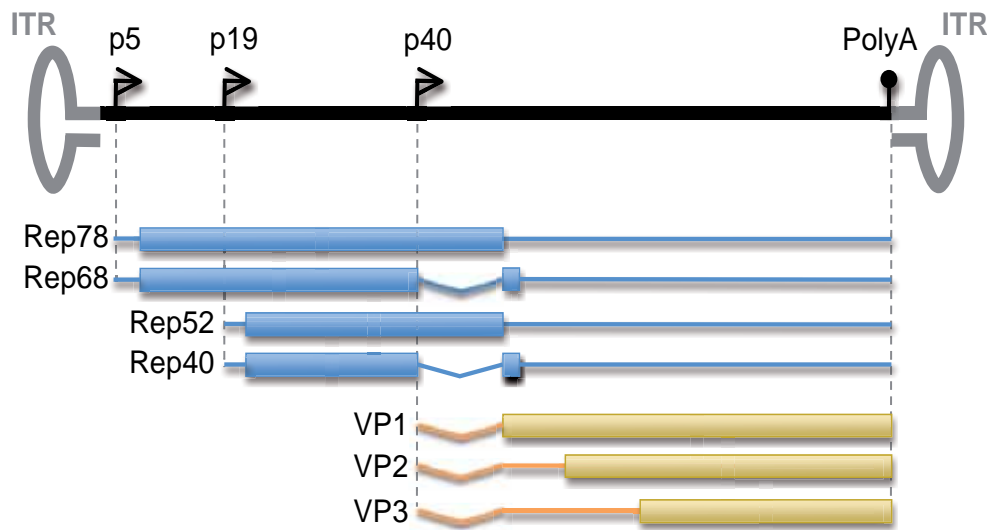


Figura 15. Representació esquemàtica del genoma del AAV2. El genoma del virus AAV2 conté 4680 nucleòtids flanquejats per dues repeticions terminals invertides (ITR). Les proteïnes reguladores (Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40) estan codificades pel gen *rep* (blau) i regulades pels promotors p5 i p19. Les proteïnes estructurals de la càpside (VP1, VP2 i VP3) estan codificades pel gen *cap* (groc) i regulades pel promotor p40. Les tres fletxes indiquen cada un dels tres promotors a les posicions 5, 19 i 40. Tots els transcrits dels AAV comparteixen la mateixa senyal de poliadenilació (poliA) (Ayuso et al., 2010a).

5.3.2. Vectors AAV recombinants

Els vectors AAV recombinants s'han generat a partir de la substitució dels gens virals *rep* i *cap* en el genoma viral pel constructe terapèutic d'elecció, flanquejat per les ITRs conservant així la capacitat d'empaquetament (Figura 16). En conseqüència, els vectors AAV estan desproveïts de qualsevol gen viral, evitant d'aquesta manera que les cèl·lules transduïdes siguin reconegudes i destruïdes pel sistema immunitari. Tot i que aquesta afirmació és certa en models animals, s'ha vist que en determinades condicions els vectors AAV podrien desencadenar respostes immunes en humans (Manno et al., 2006; Mingozzi and High, 2013; Mingozzi et al., 2009, 2013).

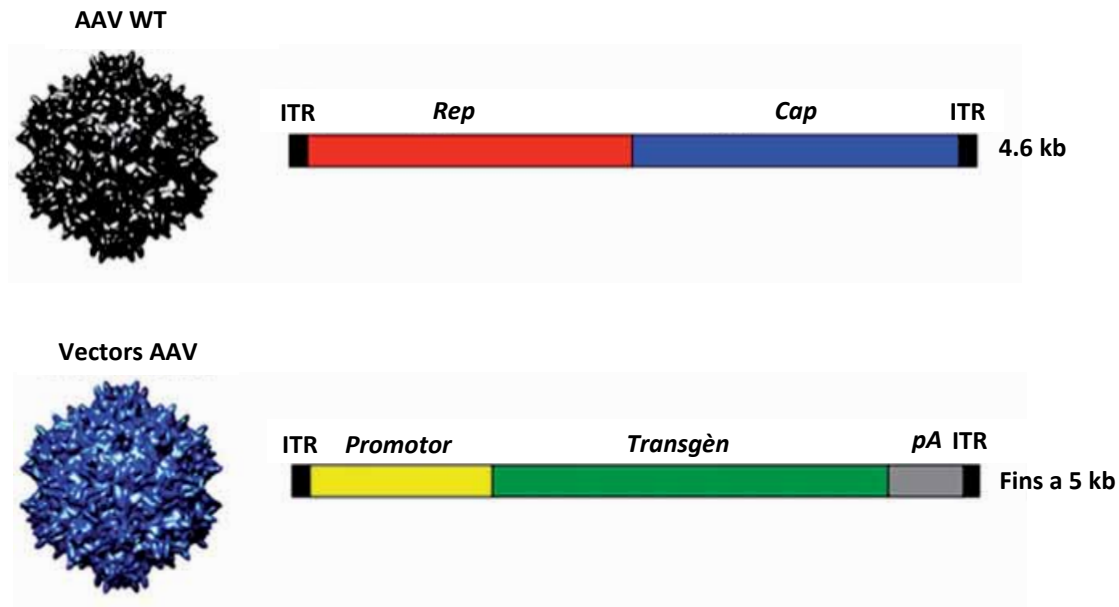


Figura 16. Representació esquemàtica del genoma del AAV. La substitució dels gens virals *rep* i *cap* del genoma del AAV salvatge (AAV wt) pel constructe terapèutic dona lloc als vectors AAV recombinants (vectors AAV). Aquests expressen un gen terapèutic controlat per un promotor determinat. (Esquema adaptat de Masat et al., 2013).

Els vectors AAV poden transduir tant cèl·lules en divisió com quiescents. Un cop dins la cèl·lula diana el 99% dels genomes dels AAV romanen episomals en el nucli de la cèl·lula hoste com a concatàmers de DNA del vector (Kay, 2011). Tot i que amb una baixa taxa, pot passar que el genoma viral s'integri al genoma de la cèl·lula hoste, normalment en zones de transcripció gènica activa o en zones on es produeix un trencament de la doble cadena de DNA (Deyle and Russell, 2009; Inagaki et al., 2008; Miller et al., 2002; Nakai et al., 2003). Un cop dins el nucli de la cèl·lula, el genoma del AAV ha de ser convertit en una doble cadena de DNA per permetre l'expressió del transgèn (Verma and Weitzman, 2005). Donat que aquest és un pas limitant per a l'expressió del vector, s'han dissenyat AAVs que contenen un genoma de doble cadena de DNA (dsAAV) per tal d'eludir el pas de la síntesi de la cadena complementària i així millorar la producció de la proteïna terapèutica (Wang et al., 2003). No obstant, la principal restricció en l'ús dels dsAAV és la seva limitada capacitat de clonatge, de no més de 2.2 kb, i la dificultat en la generació de vectors, el que impedeix el seu ús per a la transferència de molts gens d'interès. A més, s'ha estat descrit que els dsAAV potencien la resposta innata del sistema immune en comparació amb els vectors de cadena única AAV (Martino et al., 2011).

Els AAV poden ser produïts i purificats a títols elevats al laboratori (Ayuso et al., 2010a). La tècnica més comú per produir vectors AAV consisteix en un sistema de transfecció transitòria amb tres plasmidis (Figura 17). Un dels plasmidis conté el constructe terapèutic flanquejat per les dues ITRs del AAV de serotip 2. S'utilitzen aquestes ITRs ja que el AAV2 és el serotip més ben caracteritzat (Samulski et al., 1982; Srivastava et al., 1983). El segon plasmidi aporta els gens *rep* i *cap* del genoma del AAV sense les ITRs. Les diferències en la seqüència del gen *cap* determinen les diferents proteïnes que formen la càpside viral per a cada serotip d'AAV. Així, es poden generar vectors virals híbrids per mitjà de la utilització d'un segon plasmidi que codifica pel gen *rep* del AAV2 i pel gen *cap* d'un altre serotip diferent (Rabinowitz et al., 2002). Aquests dos plasmidis són cotransfectats en cèl·lules HEK-293 amb un tercer plasmidi que aporta les funcions adenovirals necessàries per a la replicació dels AAV. Després de l'expressió i traducció de les proteïnes REP i VP, el constructe terapèutic flanquejat per les ITRs és replicat i les molècules de DNA monocadena són introduïdes en les càpsides AAV preformades.

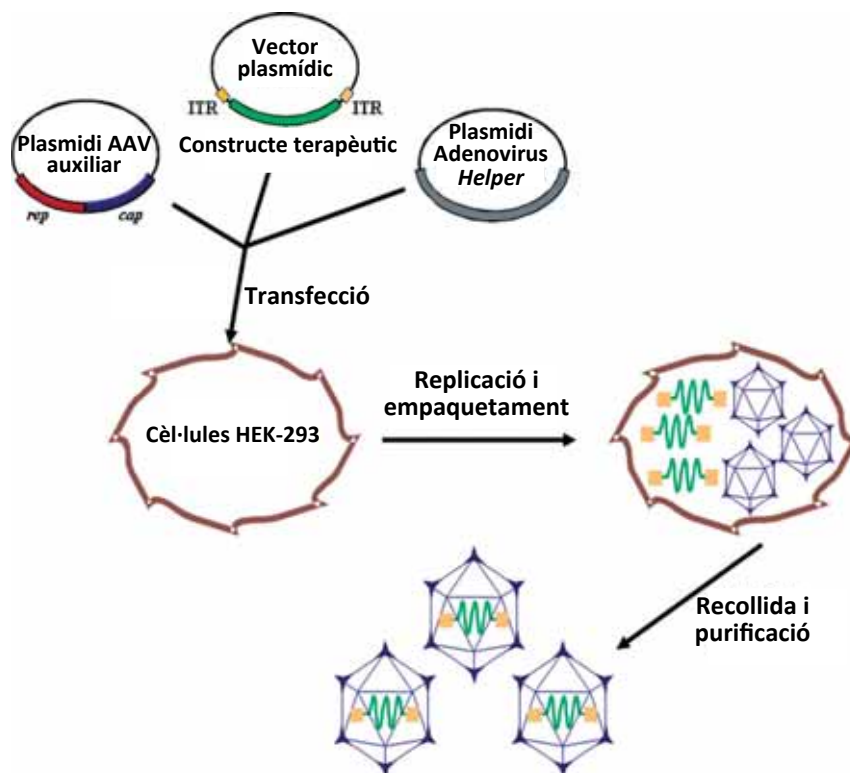


Figura 17. Producció dels AAV recombinants (rAAV) per la triple transfecció. Per a la producció de rAAV ambdós ORFs virals són reemplaçats pel transgèn flanquejat per les senyals d'empaquetament virals (ITRs). Les proteïnes virals dels gens *rep* i *cap* són aportades *in trans* pel plasmidi *helper*. Les funcions del virus auxiliars són proporcionades mitjançant la transfecció d'un tercer plasmidi que codifica pels gens adenovirals necessaris per a la producció dels AAV. (Adaptat de Büning et al., 2008).

Les partícules víriques són aleshores purificades a partir del lisat cel·lular per centrifugació en un gradient de densitat (CsCl o iodixanol) i/o per cromatografia en columna. Les preparacions del vector purificat també poden contenir càpsides buides, la quantitat de les quals depèn de l'eficàcia d'empaquetament i del mètode de purificació. El mètode de purificació que separa més eficientment les càpsides buides de les càpsides amb genoma encapsidat és la purificació per gradient de CsCl (Ayuso et al., 2010b; Scallan et al., 2006; Zolotukhin et al., 1999). En particular, el polietilenglicol (PEG) i el protocol de purificació en CsCl redueix significativament les càpsides buides dels AAV i les impureses de DNA i proteïna, augmentant així la puresa de la preparació viral que en darrer terme resulta en una major transducció *in vivo* (Ayuso et al., 2010b).

5.4. Transferència de gens al pàncrees

Malgrat els avenços en l'enginyeria de teixits *in vivo*, la transferència eficaç de gens al pàncrees ha estat difícil d'aconseguir per la seva ubicació anatòmica i estructura complexa. L'enginyeria genètica del pàncrees s'ha avaluat mitjançant vectors no virals i virals a través de diverses rutes d'administració. L'administració intraductal d'un complex DNA-liposomes va resultar en la transducció preferencial de les cèl·lules ductals amb una transducció ocasional de cèl·lules acinars (Schmid et al., 1998). L'administració sistèmica de microbombolles plenes de gas contenint un complex de DNA-fosfolípid en combinació amb la tecnologia dels ultrasons va mostrar una transducció eficient de les cèl·lules β de rata (Chen et al., 2006), però aquesta tecnologia presenta una disponibilitat limitada i és difícil de portar a terme. A més, aquests mètodes no virals esmentats proporcionen una expressió a curt termini dels gens d'interès. Els vectors adenovirals (Ad) transdueixen principalment el pàncrees exocrí quan són administrats tant per via intrapancreàtica (McClane et al., 1997; Wang et al., 2004) com per via intraductal (Morro et al., 2014; Raper and DeMatteo, 1996; Taniguchi et al., 2003). En contrast, l'administració sistèmica de vectors Ad sota el bloqueig de la circulació hepàtica descrita pel nostre laboratori, va permetre una transducció preferent de cèl·lules β en ratolins, tot i que a baix percentatge, i també en animals més grans com el gos (Ayuso et al., 2004, 2006). No obstant això, l'expressió del transgèn va ser transitòria a causa de la immunogenicitat inherent dels vectors Ad de primera generació. Els vectors lentivirals (LV) proporcionen una expressió del transgèn a llarg termini degut a la seva capacitat per integrar-se al genoma de la cèl·lula hoste. L'administració intraductal de vectors LV van ser capaç de transduir

cèl·lules ductals i acinars, però només un percentatge mínim de cèl·lules endocrines (Collombat et al., 2009; Xu et al., 2008).

En contraposició, els vectors virals adenoassociats (AAV) han mostrat ser més eficients que els vectors Ad i LV transduïnt el pàncrees (Cheng et al., 2007; Wang et al., 2004) i proporcionen una expressió a llarg termini del transgen degut a la seva manca de patogenicitat i baixa immunogenicitat. Existeixen diferents serotips de vectors AAV que presenten diferent tropisme. Els vectors AAV de serotip 8 i 9 (AAV8 i AAV9) han mostrat ser capaços de transduir tant el pàncrees exocrí com endocrí quan són administrats sistèmicament (Inagaki et al., 2006; Jimenez et al., 2011; Nakai et al., 2005), mitjançant una injecció intrapancreàtica (Cheng et al., 2007; Wang et al., 2004), intraductal (Jimenez et al., 2011; Loiler et al., 2005) o mitjançant els vasos intrapancreàtics (Maione et al., 2009). En un estudi realitzat en el nostre laboratori on es van comparar els serotips AAV6, AAV8 i AAV9 en l'eficiència de transducció del pàncrees d'animals ICR mitjançant les administracions intravenosa i intraductal, es va observar que el serotip AAV8 i la via d'administració intraductal era la combinació més eficient per a la transducció de les cèl·lules β del pàncrees. A més, aquesta administració també va permetre una àmplia distribució del vector pel teixit exocrí i nivells d'expressió elevats a llarg termini (Jimenez et al., 2011). En efecte, altres grups han escollit el vector de AAV8 com a serotip d'elecció per a la transferència de gens terapèutics en models induïts de diabetis amb STZ (Riedel et al., 2010) o en ratolins NOD (Churlaud et al., 2014; Flores et al., 2014; Gaddy et al., 2012; Montane et al., 2011; Rehman et al., 2008).

III. OBJECTIUS

Entre els possibles gens candidats al tractament de la diabetis, el factor de creixement a la insulina tipus 1 (IGF-1) destaca per les seves propietats immunomoduladores i el seu control sobre la proliferació i supervivència de la massa de cèl·lula β . El nostre laboratori ha descrit prèviament que la sobreexpressió d'IGF-1 a les cèl·lules β d'animals transgènics contrarresta la citotoxicitat i la insulitis induïda pel tractament amb STZ i potencia la regeneració de l'illot. A més, també ha demostrat que l'expressió pancreàtica d'IGF-1 prevé la destrucció de l'illot i la mort de la cèl·lula β en el ratolí transgènic per IFN β a la cèl·lula β , un model d'infiltració limfocítica del pàncrees endocrí. Aquestes resultats suggerien que la transferència gènica d'IGF-1 podria ser una aproximació terapèutica indicada pel desenvolupament d'estratègies de teràpia gènica per a contrarestar la diabetis.

Per tot això, l'objectiu general d'aquest treball va ser **estudiar el paper de la sobreexpressió pancreàtica d'IGF-1 en la protecció enfront la diabetis autoimmune en els ratolins NOD per tal de desenvolupar una nova aproximació terapèutica per la malaltia**. Aquest objectiu general es va subdividir en els següents objectius específics:

- 1. Estudiar els efectes protectors de la sobreexpressió local d'IGF-1 a les cèl·lules β dels ratolins NOD transgènics.**
 - 1.1. Generar i caracteritzar el ratolí transgènic NOD RIP-1/IGF-1 que expressa IGF-1 específicament a les cèl·lules β del pàncrees.
 - 1.2. Estudiar el paper d'IGF-1 en la prevenció de l'atac autoimmune de la cèl·lula β en el model NOD.

- 2. Desenvolupar una aproximació de teràpia gènica mitjançant la transferència amb vectors AAV del factor IGF-1 al pàncrees dels ratolins NOD.**
 - 2.1. Generar un vector AAV codificant per la proteïna IGF-1 murina.
 - 2.2. Estudiar el paper de la transferència gènica d'IGF-1 mitjançant vectors AAV en la protecció enfront el desenvolupament de diabetis en els ratolins NOD.

IV. RESULTATS

Part I:
Estudi del paper d'IGF-1 en la preservació de la
massa de cèl·lula β en el model NOD

1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DELS ANIMALS TRANSGÈNICS NOD-IGF1

1.1. Obtenció del ratolí transgènic NOD-IGF1

Ateriorment, en el nostre laboratori s'havien generat animals transgènics que sobreexpressaven el gen *Igf-1* murí específicament en cèl·lules β pancreàtiques sota el control del promotor del gen de la insulina-1 de rata (RIP-1) (George et al., 2002). Aquests ratolins, originalment generats en el fons genètic C57Bl/6-SJL i derivats a les soques CD-1 i ICR, van ser creuats amb femelles NOD durant més de 20 generacions per tal d'aconseguir un fons genètic $\sim 100\%$ NOD (Figura 18). Aquesta nova línia d'animals transgènics RIP-1/IGF-1 en el fons genètic NOD es van anomenar NOD-IGF1.

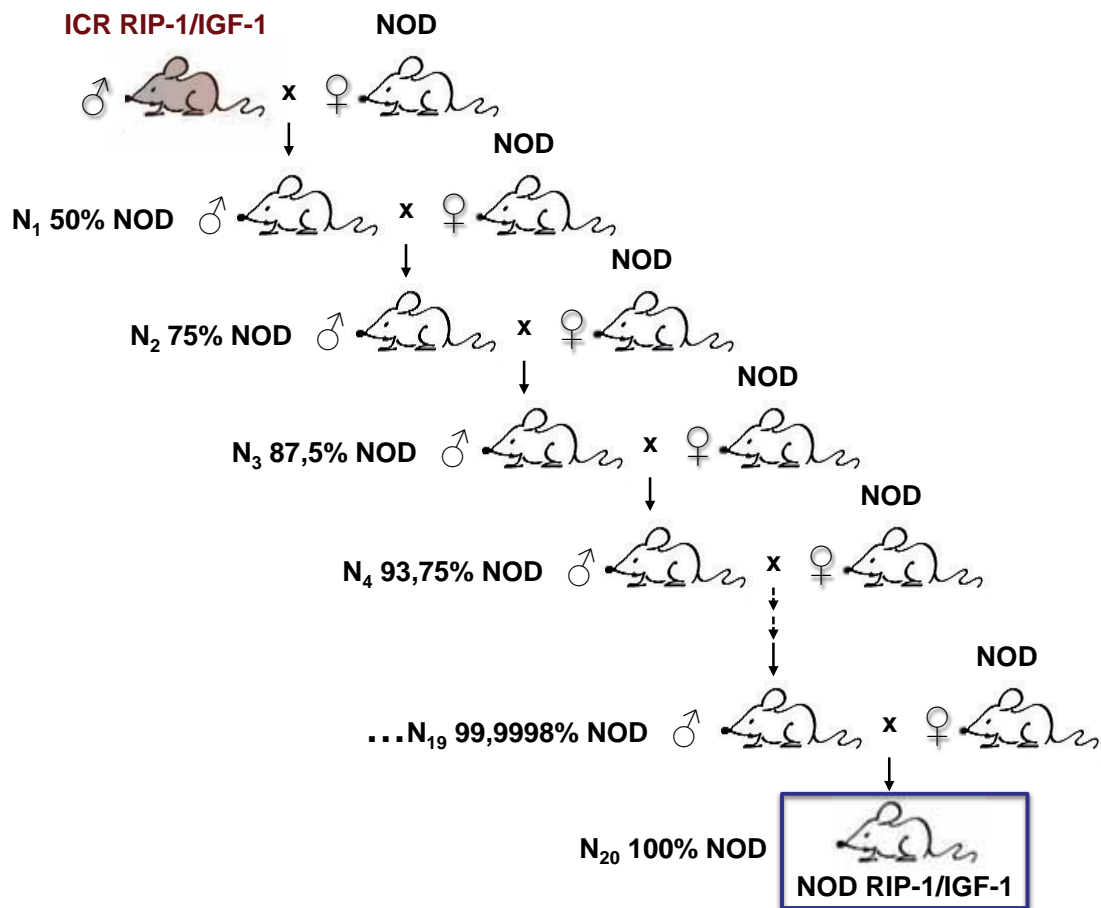


Figura 18. Esquema de retrocreuament. Esquema dels retrocreuaments efectuats per generar la colònia de ratolins transgènics RIP-1/IGF-1 en el background genètic NOD a partir d'un ratolí mascle transgènic RIP-1/IGF-1 de la soca ICR. Els resultats presentats en aquest treball s'han obtingut a partir d'animals del retrocreuament N15 en endavant (%NOD > 99,99%).

1.2. Anàlisi de la sobreexpressió d'IGF-1 als illots dels ratolins transgènics NOD-IGF1

Per tal de confirmar que els animals transgènics NOD-IGF1 presentaven una sobreexpressió del factor de creixement IGF-1 als illots pancreàtics es van mesurar els nivells d'expressió del mRNA i el contingut proteic d'IGF-1 en mostres d'illots. Es va observar que els animals transgènics NOD-IGF1 presentaven nivells molt superiors de mRNA i de proteïna IGF-1 als illots pancreàtics en comparació amb els illots d'un animal NOD no transgènic. La sobreexpressió d'IGF-1 als illots dels animals transgènics NOD-IGF1 també es va confirmar mitjançant una tinció immunohistoquímica del pàncrees contra IGF-1 (Figura 19).

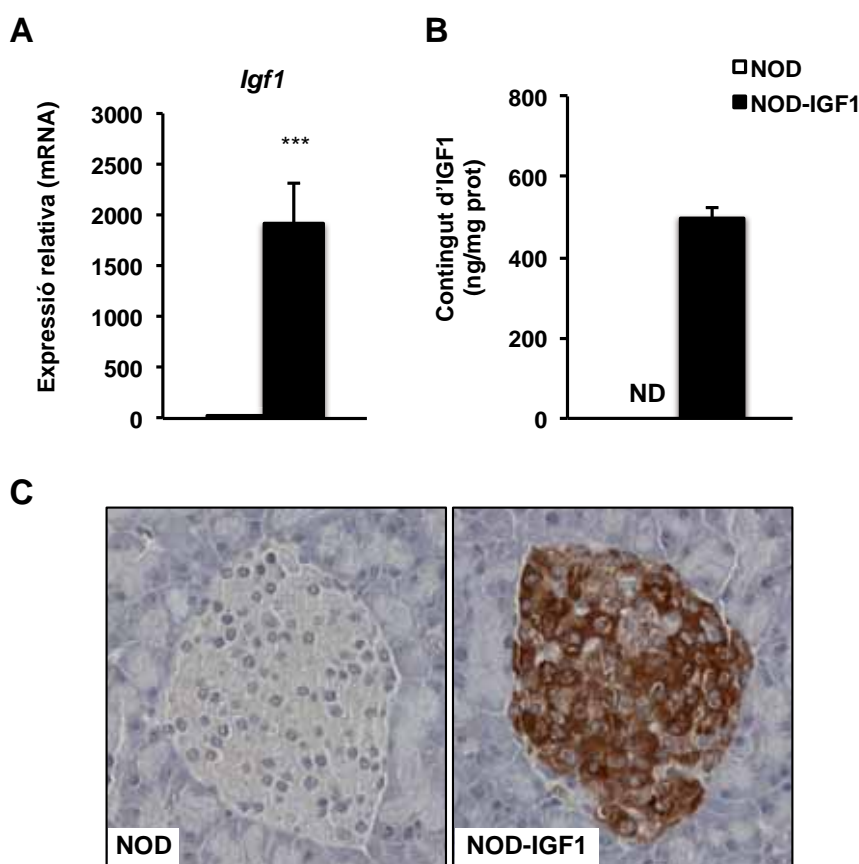


Figura 19. Sobreexpressió d'IGF1 als illots transgènics NOD-IGF1. (A) Nivells de mRNA d'*Igf-1* en illots. Valors expressats en unitats arbitràries equivalents als resultats de la qPCR normalitzats pel gen *Rplp0* i respecte als illots dels animals control NOD. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, N= 9-10 animals per grup. *** p <0.001. **(B) Contingut d'IGF1 detectat per ELISA en extractes d'illots.** Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, N= 5-6 animals per grup. ND: No detectat. **(C) Immunohistoquímica del pàncrees contra IGF1.** Fotografies a 400x. Els resultats corresponen a mostres d'animals de 8 setmanes d'edat.

Per tal de confirmar que el tipus cel·lular responsable de la producció d'IGF-1 eren les cèl·lules β dels illots pancreàtics (expressió determinada pel promotor RIP-1), es va efectuar una doble tinció immunohistoquímica contra insulina i IGF-1. Com es pot observar en la Figura 20, la col·localització del marcatge per IGF-1 (verd) amb el marcatge per insulina (vermell) va confirmar que la sobreexpressió d'IGF-1 era produïda per les cèl·lules β i que, a més, totes les cèl·lules β de l'illot expressaven el factor.

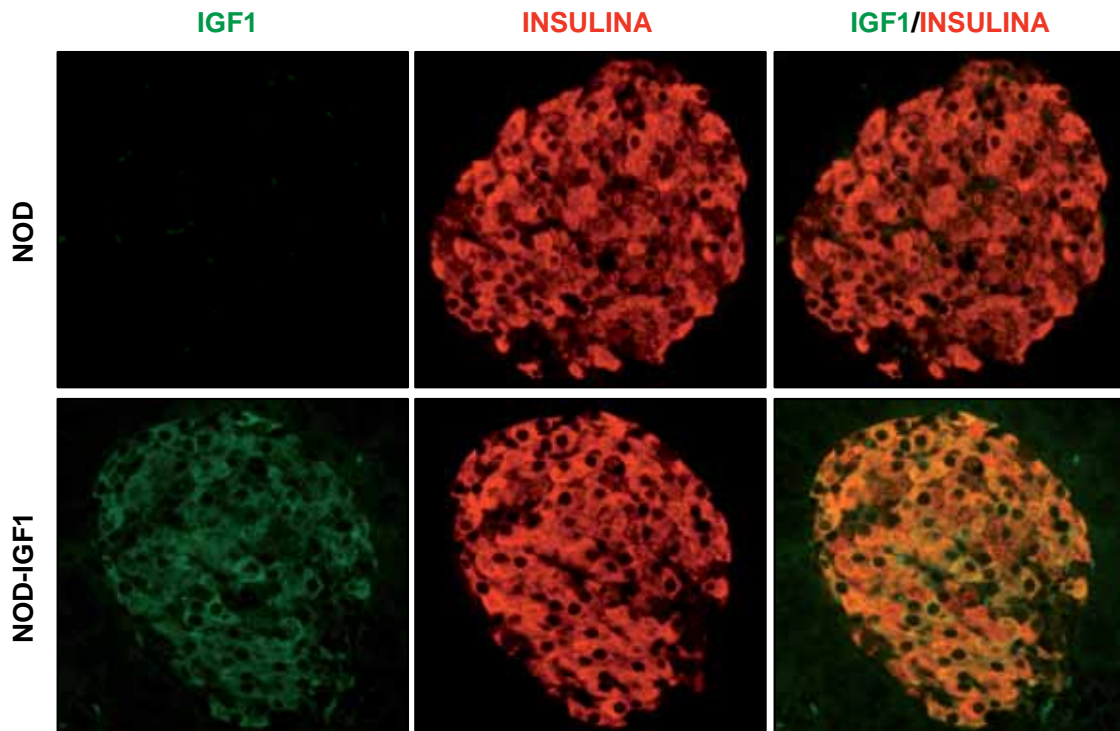


Figura 20. Expressió d'IGF1 a les cèl·lules β dels illots pancreàtics. Immunohistoquímica del pàncrees contra IGF1 (verd) i insulina (vermell) en mostres d'animals de 4 setmanes. Fotografies a 400x.

1.3. Determinació dels nivells circulants d'IGF-1

Donat que els illots són estructures abundantment irrigades i tenen la capacitat de secretar factors al torrent sanguini, es van mesurar els nivells circulants d'IGF-1 en animals controls NOD i en animals transgènics NOD-IGF1 per tal de determinar si l'increment en el contingut d'IGF-1 en els illots es correlacionava amb un increment d'IGF-1 circulant. No es van observar diferències en la concentració en sèrum d'IGF-1 (Figura 21).

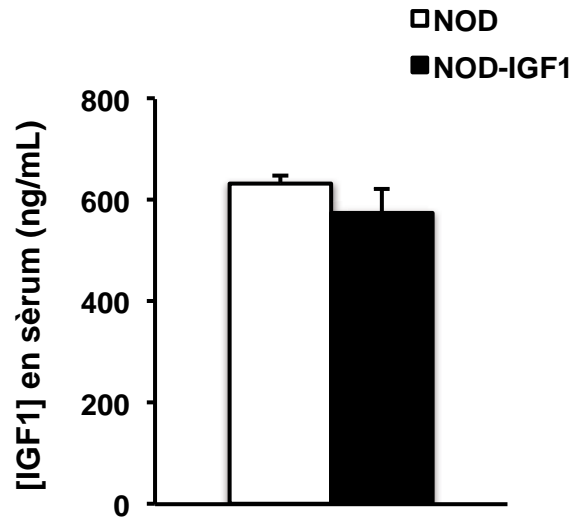


Figura 3. Nivells circulants d'IGF1. Concentració d'IGF1 mesurada mitjançant un assaig ELISA en mostres de sèrum d'animals de 15 setmanes normoglicèmics. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, N= 5 animals per grup.

Així doncs, en els animals transgènics NOD-IGF1 s'aconseguia una notable sobreexpressió del factor de creixement IGF-1 específicament a les cèl·lules β dels illots mentre que els nivells circulants d'IGF-1 no es veien alterats. Això indicava que els canvis fenotípics que es poguessin observar en els ratolins transgènics NOD-IGF1 eren conseqüència de les alteracions en el pàncrees a través d'un efecte paracrí, degut a l'increment local del factor IGF-1.

2. ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT ESPONTANI DE DIABETIS EN ELS ANIMALS NOD-IGF1

2.1. Anàlisi de la incidència de diabetis en els ratolins NOD-IGF1

Es va analitzar el percentatge de la població de femelles i mascles NOD i NOD-IGF1 que esdevenia diabètic a les instal·lacions del nostre laboratori mitjançant el seguiment dels valors de glucèmia dels animals. Tal i com s'esperava, una part dels individus NOD control esdevenia diabètic amb el pas del temps. La incidència de diabetis en el grup NOD va ser del 70% en femelles i del 20% en mascles a les 30 setmanes d'edat, amb diferents pics de manifestació clínica de diabetis al llarg del seguiment. Per contra, els ratolins transgènics NOD-IGF1 van presentar una clara protecció al desenvolupament de diabetis amb una incidència del 3% en femelles i del 0% en mascles a les 30 setmanes d'edat (Figura 22).

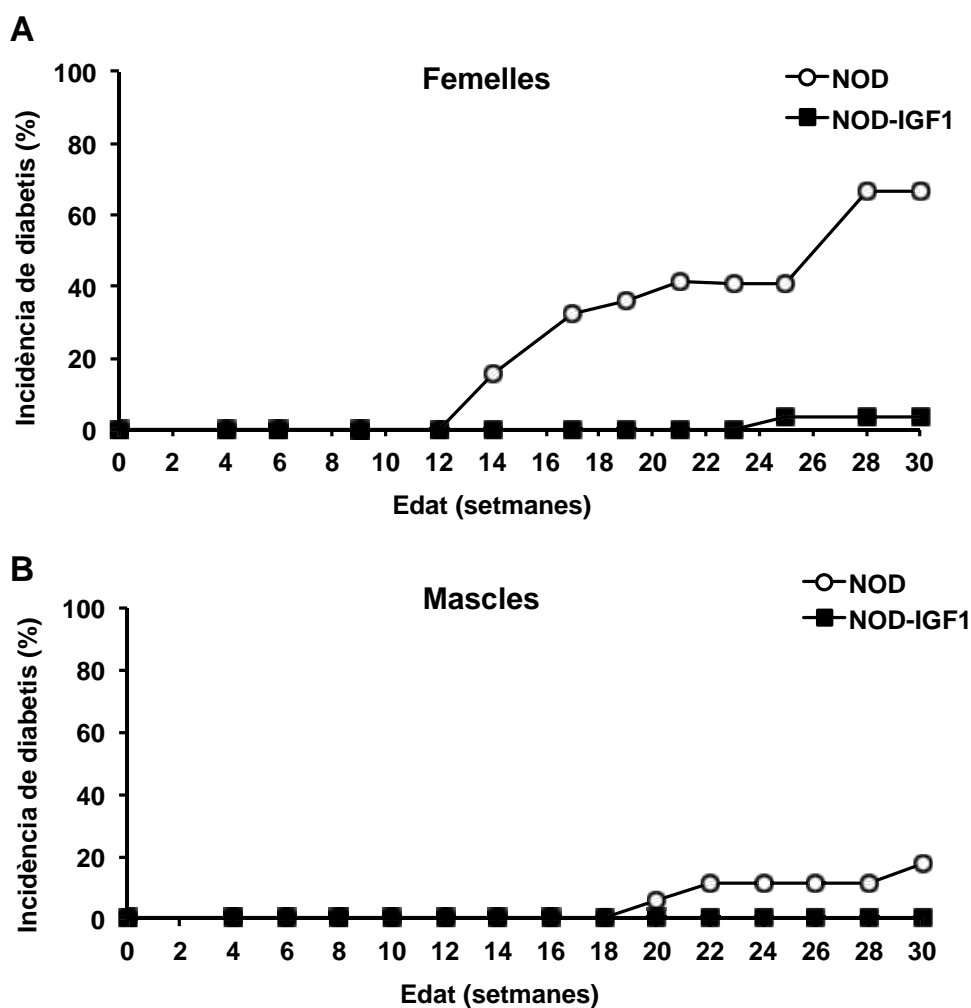


Figura 22. Incidència de diabetis als ratolins NOD i NOD-IGF1. Es va considerar si un individu era diabètic quan la seva glucèmia superava els 250 mg/dl en dues mesures consecutives. **(A) Incidència de diabetis en femelles.** N=34 femelles NOD i N=32 femelles NOD-IGF1. **(B) Incidència de diabetis en mascles.** N=19 mascles NOD i N=17 mascles NOD-IGF1.

Els resultats obtinguts indicaven que independentment del sexe, els ratolins transgènics NOD-IGF1 estaven protegits enfront el desenvolupament de diabetis. Això era d'especial rellevància en el cas de les femelles, ja que representen el principal sexe afectat pel desenvolupament de diabetis en els ratolins NOD. Entre les 32 femelles NOD-IGF1 analitzades, només 1 va esdevenir diabètica a les 30 setmanes d'edat.

2.2. Seguiment de la glucèmia amb l'edat

A partir del seguiment dels valors de glucèmia de la colònia de ratolins NOD i NOD-IGF1 es va representar l'evolució d'aquest paràmetre amb el temps. Pel que fa a les femelles, el grup NOD presentava valors d'hiperglucèmia a partir de les 14 setmanes d'edat. En canvi, els ratolins transgènics NOD-IGF1 femella eren capaços de mantenir valors de normoglucèmia al llarg de les 30 setmanes de seguiment (Figura 23A). Pel que fa als mascles, els primers valors d'hiperglucèmia en els animals NOD es van detectar més tard, a l'edat de 18 setmanes. En contraposició, i de manera similar al que passava amb les femelles, els mascles transgènics NOD-IGF1 també van mantenir nivells normoglucèmics durant tot el seguiment (Figura 23B).

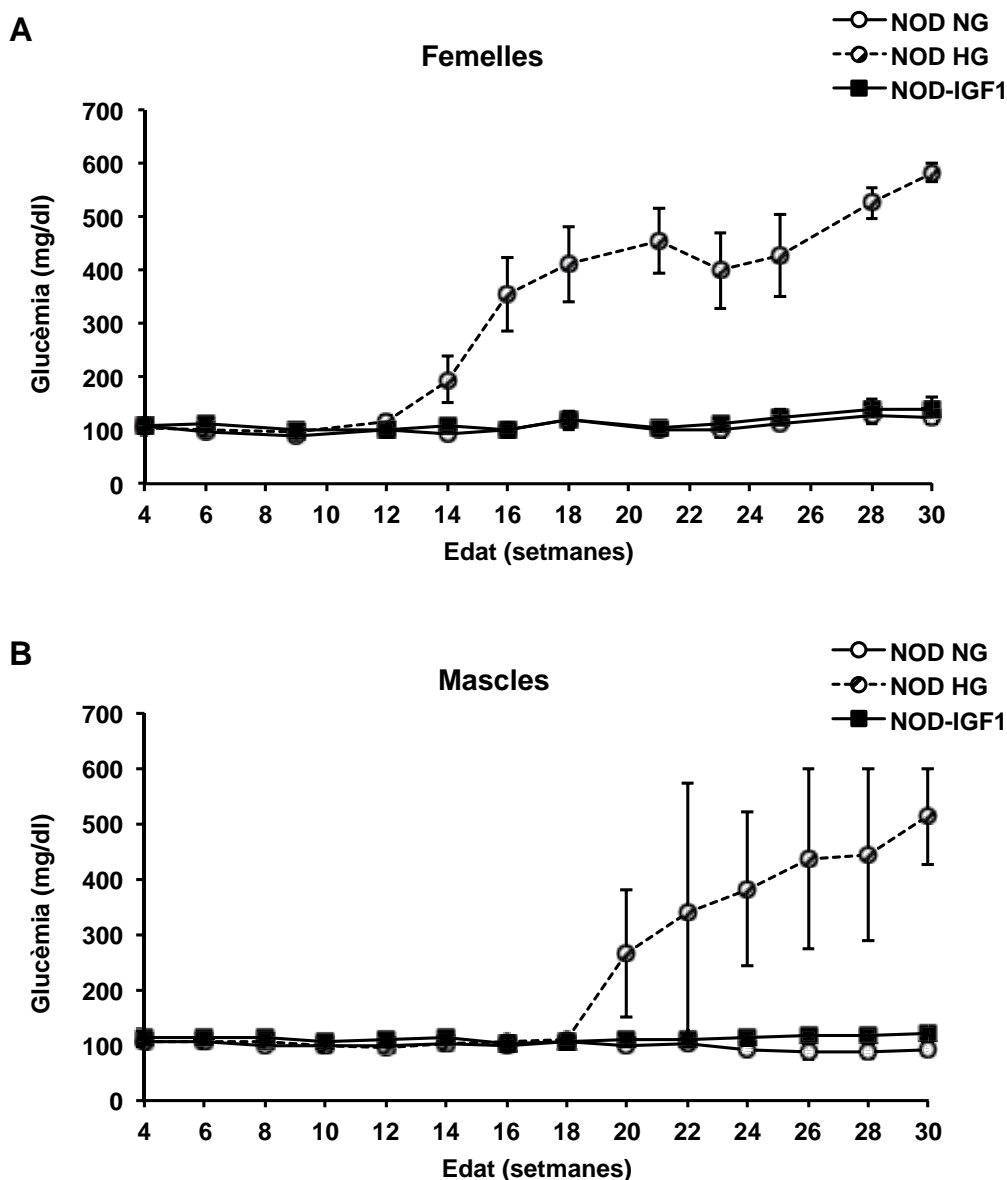


Figura 23. Evolució de la glucèmia en els ratolins femelles i mascles NOD i NOD-IGF1. Es va fer un seguiment de la glucèmia en alimentació en els individus de la colònia fins a les 30 setmanes d'edat. **(A) Evolució de la glucèmia de les femelles.** Es van seguir un total de 34 femelles NOD, de les quals 22 van esdevenir hiperglucèmiques; i 32 femelles NOD-IGF1. **(B) Evolució de la glucèmia dels mascles.** Es van seguir un total de 19 mascles NOD, dels quals 3 van esdevenir hiperglucèmics; i 17 mascles NOD-IGF1 que van romandre normoglucèmics. NG: Normoglucèmic. HG: Hiperglucèmic. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM. Els individus tant mascles com femelles que van esdevenir diabètics en algun punt del seguiment es van tractar com a grup HG des de l'inici del seguiment.

El seguiment de les glucèmies amb l'edat va permetre observar que l'aparició de diabetis oberta en els animals NOD no era sincronitzada, sinó que s'iniciava a diferents edats dintre del mateix grup d'animals, originant-se en alguns casos a les 14 setmanes i, en d'altres, a les 25 setmanes. A més, l'increment dels valors de glucosa en sang en els animals NOD control tenia lloc de manera molt aguda. És a dir, un animal podia passar de valors normals de glucèmia a nivells superiors a 600 mg/dl en la següent mesura.

D'acord a l'evolució de la glucèmia de la Figura 23A, els estudis realitzats en aquesta tesi doctoral es van dur a terme en individus femella classificats en tres etapes diferents d'acord a l'evolució de la malaltia: **pre-diabetis** (4-8 setmanes d'edat), **inici de diabetis** (14-18 setmanes d'edat), i **diabetis oberta** (25 a 30 setmanes d'edat) (Figura 24).

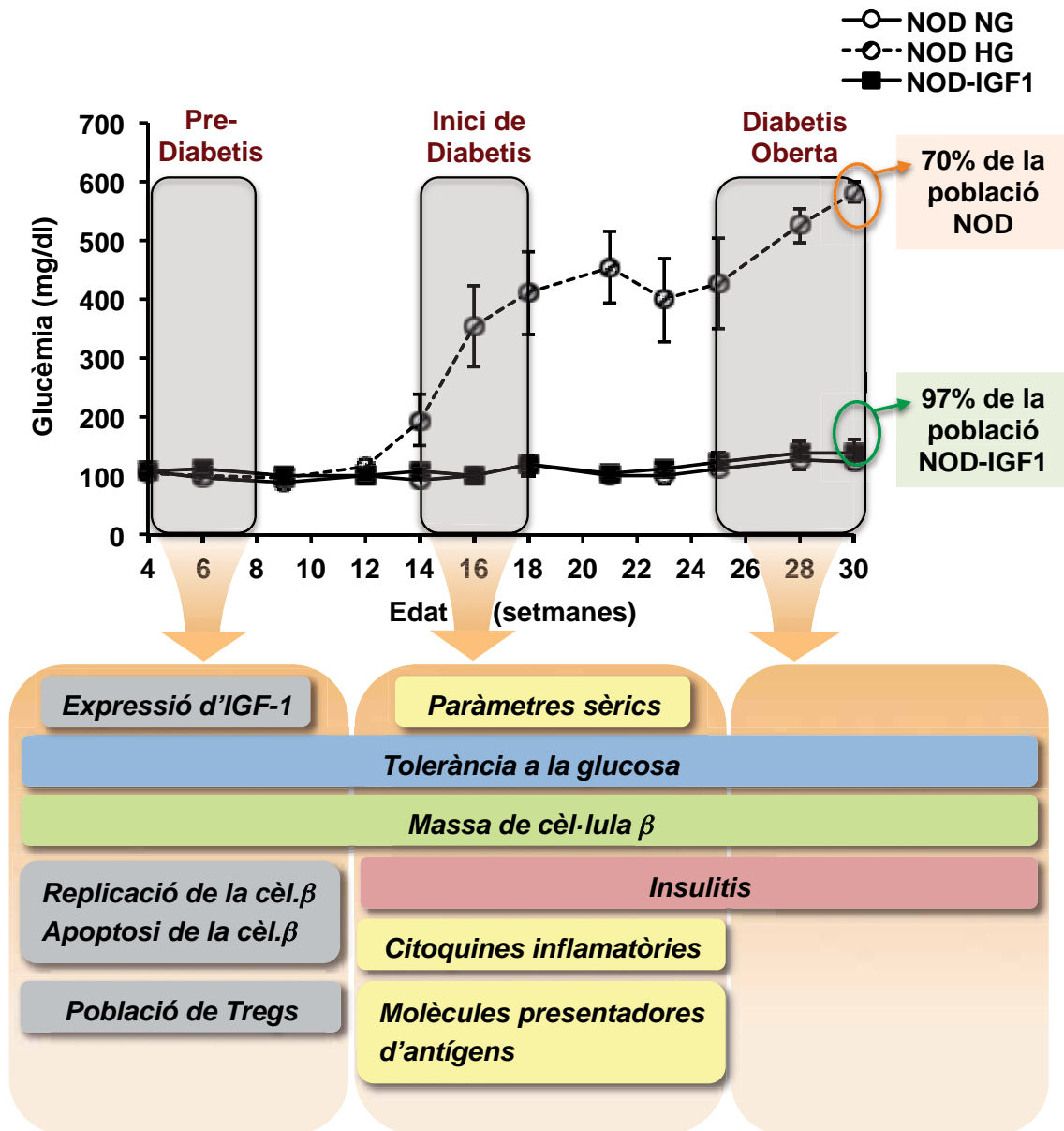


Figura 24. Classificació de les diferents etapes d'evolució de la malaltia i paràmetres analitzats. A partir del seguiment de la glucèmia de les femelles representat en la Figura 23A es van establir les diferents etapes d'estudi del desenvolupament de diabetis en les femelles de la colònia NOD-IGF1. Pre-diabetis (4-8 setmanes d'edat), inici de diabetis (14-18 setmanes d'edat), i diabetis oberta (25 a 30 setmanes d'edat). En la Figura s'indiquen també els paràmetres analitzats a cada etapa.

3. FUNCIONALITAT DE LA CÈL·LULA β EN ELS RATOLINS TRANSGÈNICS NOD-IGF1

Una de les característiques de la diabetis tipus 1 és l'alteració de la tolerància a la glucosa. Per això, a més de la normalització dels valors de glucèmia, la reversió del fenotip diabètic requereix el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa enfront d'una sobrecàrrega de sucre. Així, els ratolins NOD i NOD-IGF1 van ésser sotmesos a un test de tolerància a la glucosa (GTT) administrada intraperitonealment amb la finalitat d'estudiar la funcionalitat de la cèl·lula β i determinar si els ratolins transgènics NOD-IGF1 presentaven canvis en la capacitat de restablir la glucèmia circulant en comparació amb els ratolins control NOD. Els tests es van realitzar a les diferents etapes d'evolució del procés diabètic: pre-diabetis, inici de diabetis i diabetis oberta.

3.1. Anàlisi de la tolerància a la glucosa: pre-diabetis

Animals control NOD i animals transgènics NOD-IGF1 de 8 setmanes, edat a la qual encara no s'ha posat de manifest l'aparició de diabetis oberta, van ser administrats amb una dosi de 2 g/kg de pes corporal de glucosa per via intraperitoneal. Un cop administrada la glucosa, es va dur a terme el seguiment de la glucèmia a diferents temps durant 2 hores. Es va observar que, a aquesta edat, els ratolins NOD i NOD-IGF1 presentaven corbes similars de tolerància a la glucosa dins de la normalitat (Figura 25).

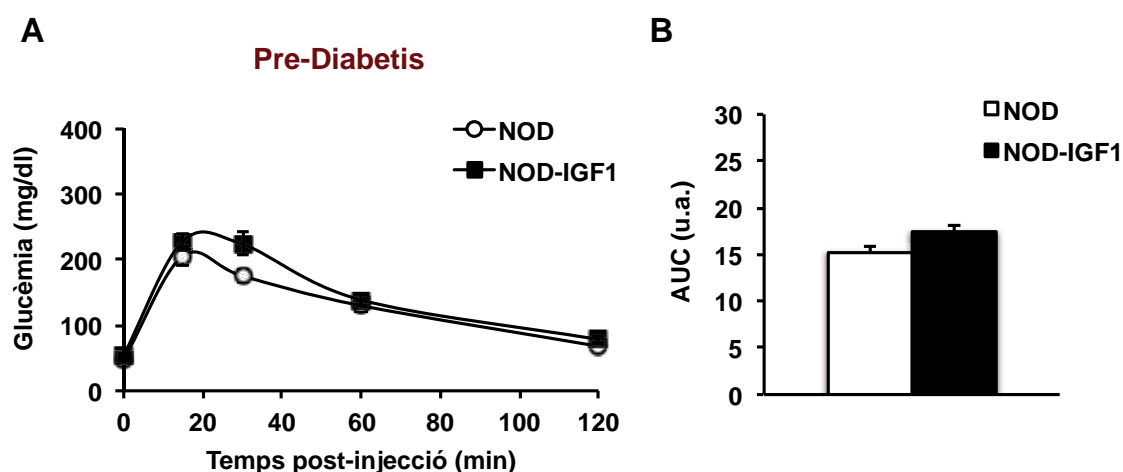


Figura 25. Test de tolerància a la glucosa en animals NOD i NOD-IGF1 pre-diabètics. Es va realitzar un test de tolerància a la glucosa en animals pre-diabètics de 8 setmanes d'edat. Els animals es van dejunar durant 16 hores i se'ls va administrar una dosi de 2 g/kg de glucosa intraperitoneal. **(A)** Valors de glucèmia just abans de la injecció i als minuts 15, 30, 60 i 120 posteriors a la injecció de glucosa. **(B)** Àrea sota la corba (AUC). Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM, N=6-8 animals per grup.

Això indicava que la sobreexpressió d'IGF-1 a les cèl·lules β dels ratolins transgènics NOD-IGF1 no alterava la capacitat de resposta enfront una sobrecàrrega de glucosa en comparació als ratolins NOD no transgènics.

3.2. Anàlisi de la tolerància a la glucosa: inici de diabetis

A les 15 setmanes, ja s'havia produït el desenvolupament espontani de diabetis en alguns ratolins NOD control. Degut a la presència d'animals hiperglucèmics, la tolerància a la glucosa va ser avaluada mitjançant l'administració d'una dosi intraperitoneal de glucosa inferior al cas anterior (1 g/kg de pes corporal). Com es pot observar en la Figura 26, els animals NOD hiperglucèmics mostraven valors molt elevats de glucèmia en dejú i eren incapaçs de respondre a la sobrecàrrega de glucosa. Per contra, els animals NOD normoglucèmics i els animals transgènics NOD-IGF1 presentaven una glucèmia en dejú i una corba de resposta a la glucosa similar. Tot i així, de manera estadísticament significativa als 30 minuts després de la injecció de glucosa, es va poder observar com els ratolins NOD normoglucèmics eren lleugerament més intolerants que els ratolins transgènics NOD-IGF1. De fet, 3 dels 5 ratolins NOD normoglucèmics en el moment del test, van esdevenir diabètics amb el transcurs de les setmanes.

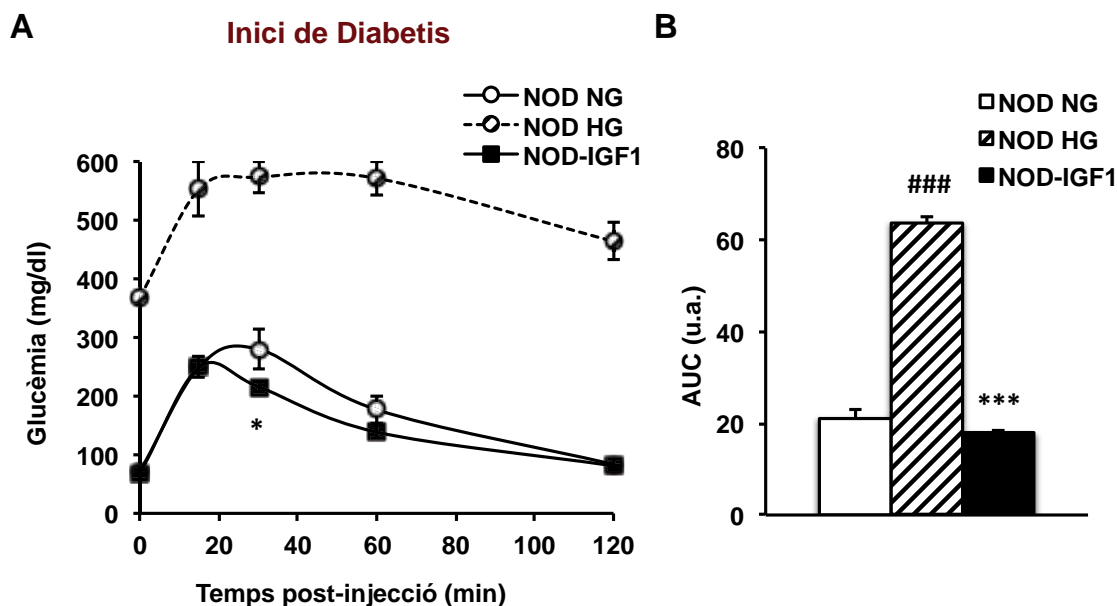


Figura 26. Test de tolerància a la glucosa en animals NOD i NOD-IGF1 a l'inici de la diabetis. Es va realitzar un test de tolerància a la glucosa en animals de 15 setmanes d'edat. Els animals es van dejunar durant 16 hores i se'ls va administrar una dosi de 1 g/kg de glucosa intraperitoneal. **(A)** Valors de glucèmia just abans de la injecció i als minuts 15, 30, 60 i 120 posteriors a la injecció de glucosa. **(B)** Àrea sota la corba (AUC). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, ### $p < 0.05$ vs. NOD NG; *** $p < 0.05$ vs. NOD HG. N=5 animals NOD NG; N=2 animals NOD HG; N=8 animals NOD-IGF1. NG: Normoglucèmic. HG: Hiperglucèmic.

3.3. Anàlisi de la tolerància a la glucosa: diabetis oberta

Finalment, es va realitzar el test de tolerància a les 25 setmanes d'edat dels ratolins, moment on els individus es troben en fase de diabetis oberta, mitjançant l'administració intraperitoneal d'1 g/kg de glucosa. Es va poder observar com tots els ratolins transgènics NOD-IGF1 continuaven presentant un perfil normal de tolerància i mantenien la capacitat de respondre a la sobrecàrrega de glucosa (Figura 27). En canvi, a aquesta edat la majoria d'individus NOD havia esdevingut diabètic obert i la mortalitat d'aquest grup era molt elevada, per això, al GTT de les 25 setmanes només es va incloure el grup NOD normoglicèmic i el grup transgènic NOD-IGF1. El gràfic de la Figura 27 mostra com els ratolins transgènics NOD-IGF1 presentaven una corba de resposta a la glucosa similar als animals NOD normoglicèmics. Això indicaria que els animals NOD-IGF1 mantenien la tolerància a la glucosa al llarg de l'edat i també els ratolins NOD que eren normoglicèmics eren capaços de conservar la funcionalitat de la cèl·lula β .

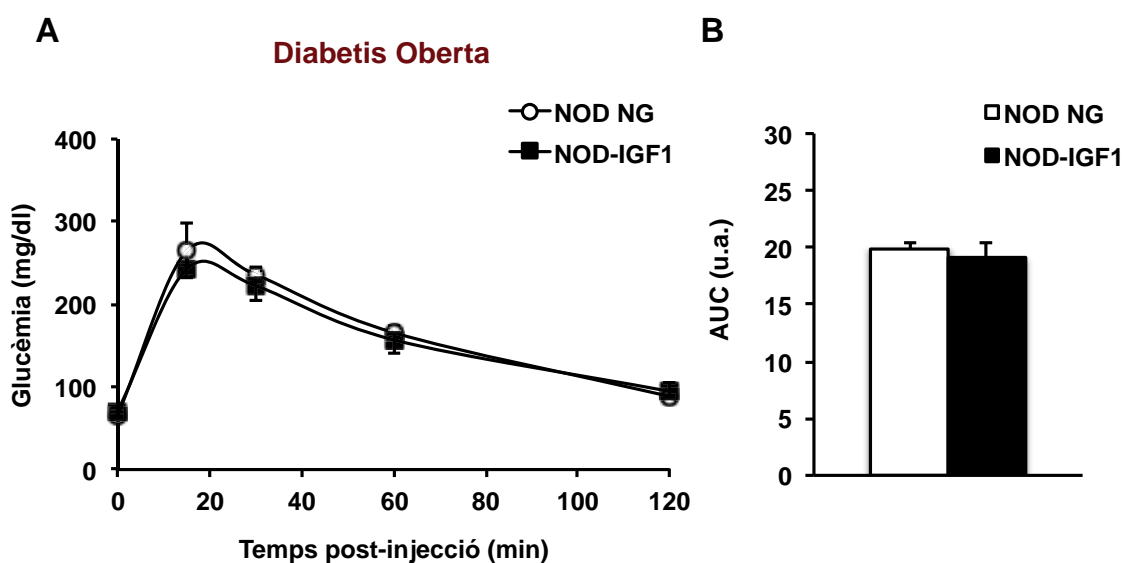


Figura 27. Test de tolerància a la glucosa en animals NOD i NOD-IGF1 a l'etapa de diabetis oberta. Es va realitzar un test de tolerància a la glucosa en animals de 25 setmanes d'edat. Els animals es van dejunar durant 16 hores i se'ls va administrar una dosi de 1g/kg de glucosa intraperitoneal. **(A)** Valors de glucèmia just abans de la injecció i als minuts 15, 30, 60 i 120 posteriors a la injecció de glucosa. **(B)** Àrea sota la corba (AUC). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM. N=2 animals NOD NG; N=9 animals NOD-IGF1. NG: Normoglicèmic.

Així doncs, els tests de tolerància a la glucosa realitzats a les diferents etapes d'evolució de la malaltia, il·lustrats a les Figures 25, 26 i 27, posaven de manifest com els ratolins NOD esdevenien intolerants a la glucosa amb l'edat, mentre que els animals transgènics NOD-IGF1 mantenien la capacitat de resposta davant una sobrecàrrega de

glucosa. Això indicava que la sobreexpressió d'IGF-1 a les cèl·lules β dels animals transgènics NOD-IGF1 era capaç de preservar la funcionalitat de la massa de cèl·lules β prevenint la intolerància a la glucosa i el desenvolupament de diabetis.

4. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS A L'INICI DE DIABETIS

Quan es produeix una disrupció en l'homeòstasi de la glucosa, altres paràmetres sèrics a més de la glucèmia es veuen afectats. L'absència de la senyalització de la insulina, que regula la lipòlisi, comporta la degradació dels triglicèrids al teixit adipós i l'alliberació d'àcids grassos al torrent circulatori. Aquests àcids grassos alliberats són parcialment oxidats al fetge i convertits en cossos cetònics (acetoacetat, β -hidroxibutirat i acetona) (Prentki and Madiraju, 2012). Amb la finalitat d'avaluar l'estat d'aquests indicadors metabòlics en els ratolins NOD-IGF1, es van mesurar diversos paràmetres sèrics com la insulina, els triglicèrids, els àcids grassos lliures i el β -hidroxibutirat a l'inici de la diabetis (Figura 28).

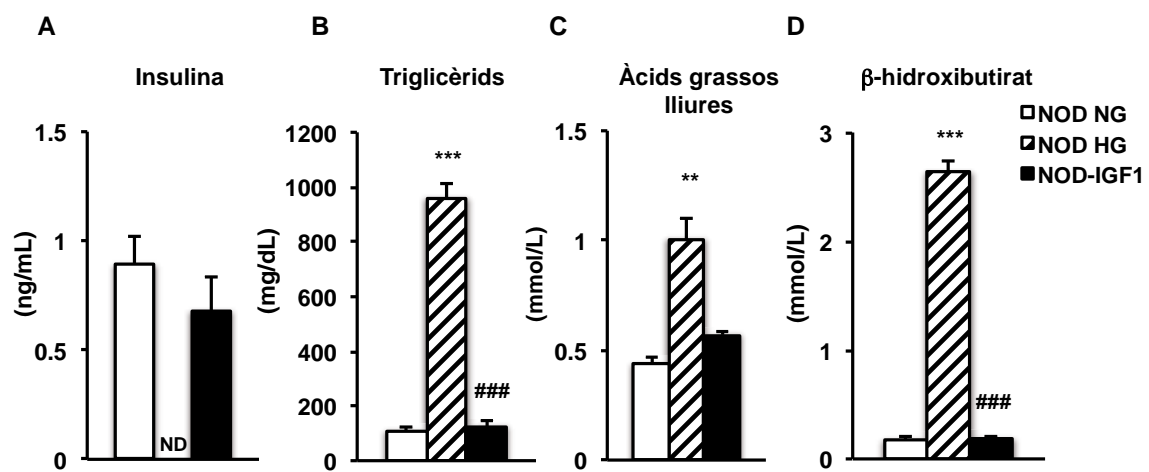


Figura 28. Paràmetres metabòlics en sèrum. (A-D) Concentració circulant de paràmetres sèrics en mostres d'animals de 15 setmanes d'edat en alimentació. (A) insulina; (B) triglicèrids; (C) àcids grassos lliures i (D) β -hidroxibutirat. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, N= 5 animals per grup. *** p <0.001 vs. NOD NG; ** p <0.01 vs. NOD NG; ### p <0.001 vs. NOD HG. NG: Normoglicèmic. HG: Hiperglicèmic. ND: No detectat.

Els animals NOD hiperglicèmics presentaven nivells no detectables d'insulina circulant (Figura 28A). A més, també van mostrar valors elevats de triglicèrids, àcids grassos lliures i cossos cetònics en forma de β -hidroxibutirat (Figura 28B, C, D). Aquestes alteracions observades podien ser conseqüència directa de la pèrdua de senyalització de la insulina. En canvi, els animals transgènics NOD-IGF1 mantenien la insulinèmia circulant i no mostraven alteracions en la resta de paràmetres mesurats, indicant la correcció del fenotip diabètic també a nivell d'altres marcadors sèrics de l'homeòstasi de la glucosa.

5. ESTUDI MORFOLÒGIC DEL PÀNCREES EN INDIVIDUS PRE-DIABÈTICS

Per tal de poder estudiar si hi havia canvis en la morfologia dels illots de Langerhans que poguessin explicar les diferències en la incidència de diabetis i la tolerància a la glucosa dels ratolins NOD-IGF1, es va dur a terme un estudi morfològic dels pàncrees.

5.1. Distribució de les cèl·lules endocrines de l'illot

En els illots de ratolí, els diferents tipus de cèl·lules endocrines estan distribuïdes de forma que les cèl·lules β , es troben al centre de l'illot i, la resta, a la perifèria. A més, l'organització de les cèl·lules a dins de l'illot és molt important pel correcte funcionament del pàncrees endocrí (Shih et al., 2002). Per tal d'examinar la morfologia i la distribució de les cèl·lules endocrines pancreàtiques dels animals transgènics NOD-IGF1 dins de l'illot es va dur a terme una anàlisi immunohistoquímica dels illots en un estadi previ a l'aparició de diabetis. Es va observar que no hi havia diferències en la distribució de les cèl·lules α , productores de glucagó, ni en la distribució de les cèl·lules β , productores d'insulina, entre els ratolins NOD i NOD-IGF1 (Figura 29).

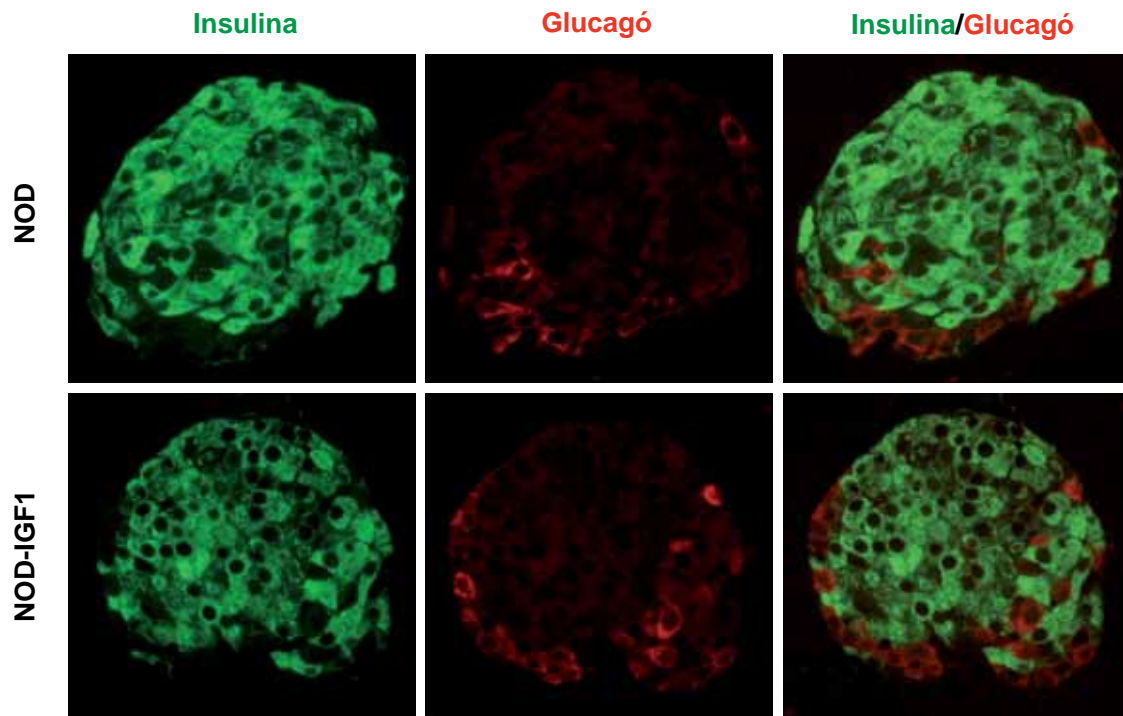


Figura 29. Organització de l'illot pancreàtic. Immunohistoquímica del pàncrees contra insulina (verd) i glucagó (vermell) en mostres d'animals pre-diabètics de 4 setmanes. Fotografies a 400x.

5.2. Distribució dels illots de Langerhans en el pàncrees

El total d'illots de Langerhans d'un individu varia des d'illots constituïts per petites agrupacions de cèl·lules (<10 cèl·lules) fins a illots de grans dimensions (>100 cèl·lules) que es troben distribuïts al llarg de tot el pàncrees (Jo et al., 2007). Aquest paràmetre és important ja que la mida de l'illot determina les interaccions entre les cèl·lules β que conté, i aquestes actuen de manera coordinada en la secreció d'insulina. Per tal d'estudiar si la sobreexpressió d'IGF-1 en les cèl·lules β dels animals transgènics provocava canvis en la quantitat o mida dels illots de Langerhans, es van determinar aquests paràmetres mitjançant una tinció immunohistoquímica contra insulina en talls histològics de pàncrees d'individus pre-diabètics (Figura 30). L'aspecte morfològic dels pàncrees era similar entre els individus NOD i NOD-IGF1. No obstant, la quantificació del nombre d'illots per àrea de teixit va revelar un augment significatiu en la proporció d'illots pancreàtics als ratolins transgènics NOD-IGF1 (Figura 30B). Per altra banda, no es van detectar canvis en el pes del pàncrees dels animals (Figura 30C).

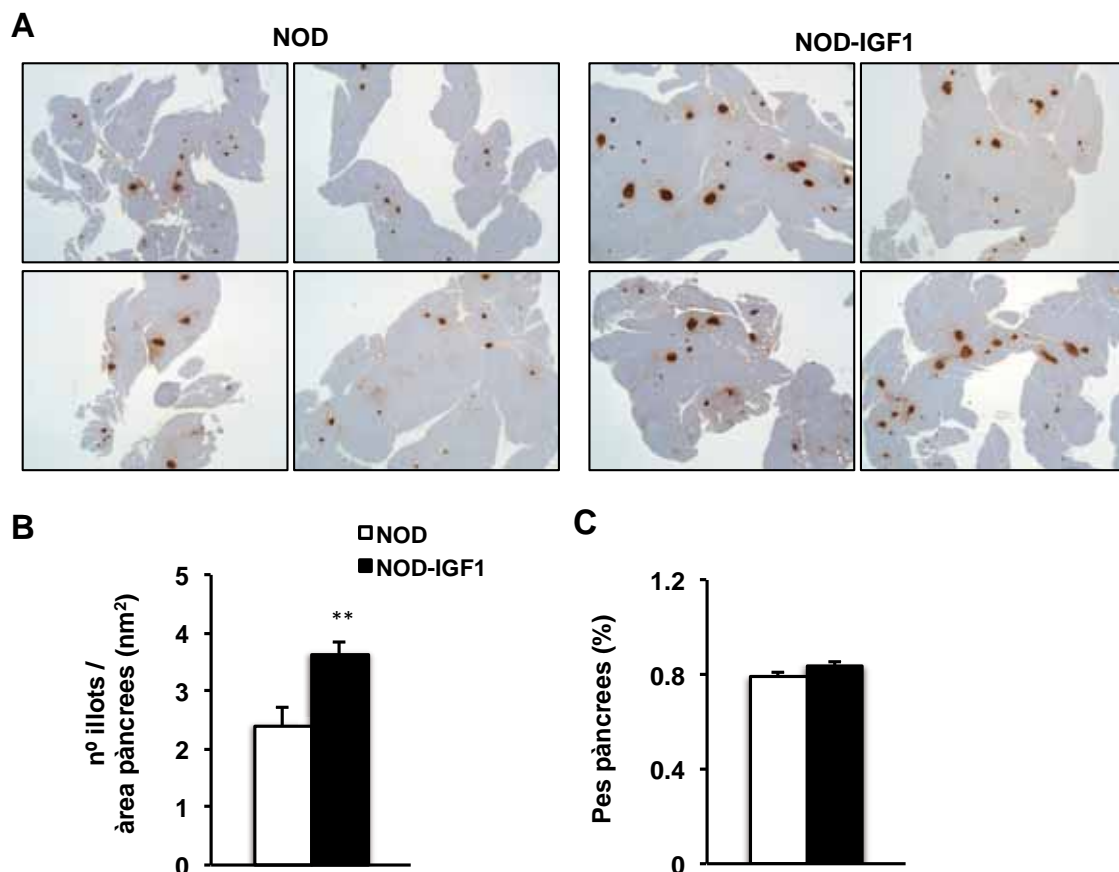


Figura 30. Anàlisi histològica del pàncrees en individus pre-diabètics. (A) Immunohistoquímica del pàncrees contra insulina. Fotografies a 20x. **(B) Illots per àrea.** Recompte del número d'illots normalitzats per àrea de pàncrees mesurada. ** $p < 0.01$. **(C) Pes del pàncrees.** Percentatge del pes del pàncrees (g) normalitzat pel pes corporal total de l'individu (g). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, N= 6 animals de 4 setmanes per grup.

Amb l'objectiu de caracteritzar aquest augment del nombre d'illots observat en els ratolins transgènics, es va efectuar un recompte dels illots pancreàtics classificant-los en funció de la seva àrea insulina positiva. El resultat va permetre observar que els pàncrees dels ratolins transgènics NOD-IGF1 presentaven un major nombre d'illots per a totes les categories de mida d'àrea d'illot analitzades (Figura 31). Això indicava que la sobreexpressió d'IGF-1 en els ratolins transgènics no provocava l'augment aïllat d'una categoria concreta de mida d'illot sinó que, en general, els animals transgènics NOD-IGF1 presentaven més illots de totes les mides en comparació amb el model diabètic NOD.

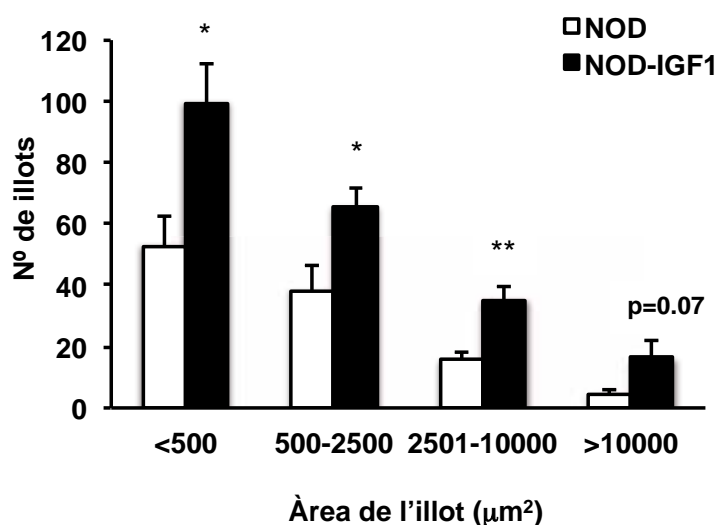


Figura 31. Distribució absoluta dels illots en funció de la seva àrea. Es va representar el perfil de distribució absoluta dels illots detectats en tres talls histològics independents del pàncrees de cada individu. Els illots van ésser classificats en funció de la seva àrea insulina positiva en quatre categories: illots amb una àrea inferior a $500 \mu\text{m}^2$, illots amb una àrea compresa entre 500 i $2500 \mu\text{m}^2$, illots amb una àrea compresa entre 2501 i $10000 \mu\text{m}^2$ i finalment illots amb una àrea superior a $10000 \mu\text{m}^2$. Es van classificar un total de 667 illots NOD i 1297 illots NOD-IGF1. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. N= 6 animals de 4 setmanes per grup.

Quan es va normalitzar el nombre d'illots de cada categoria respecte al nombre total d'illots quantificats (obtenint-se el percentatge o representació d'illots d'una determinada mida) no es van observar canvis per a cap de les categories en els ratolins transgènics NOD-IGF1 comparats amb els animals NOD (Figura 32).

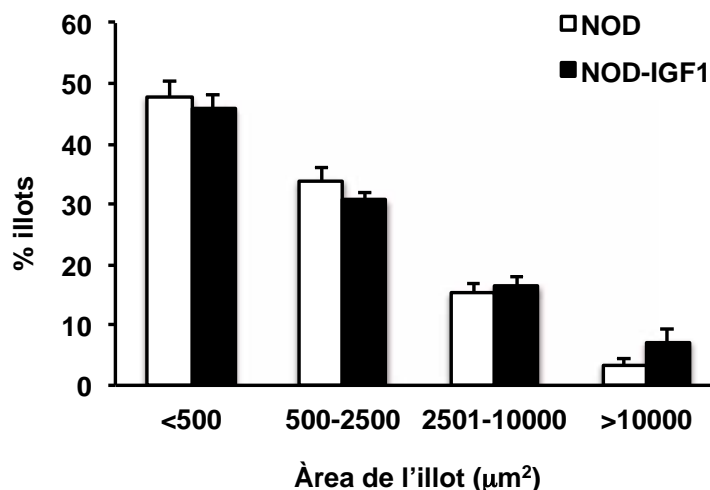


Figura 32. Distribució relativa dels illots en funció de la seva àrea. Es va representar el percentatge d'illots d'una determinada àrea respecte el total d'illots analitzats obtenint-se el perfil de distribució relativa dels illots. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, N= 6 animals per grup.

5.3. Determinació de la massa de cèl·lula β a les diferents etapes d'evolució del procés diabètic

A partir de la tinció immunohistoquímica de talls histològics de pàncrees contra insulina es va realitzar una anàlisi morfomètrica per quantificar la massa de cèl·lules β a les diferents etapes d'evolució de la diabetis: pre-diabetis (4 setmanes), inici de diabetis (15 setmanes) i diabetis oberta (30 setmanes) (Figura 33).

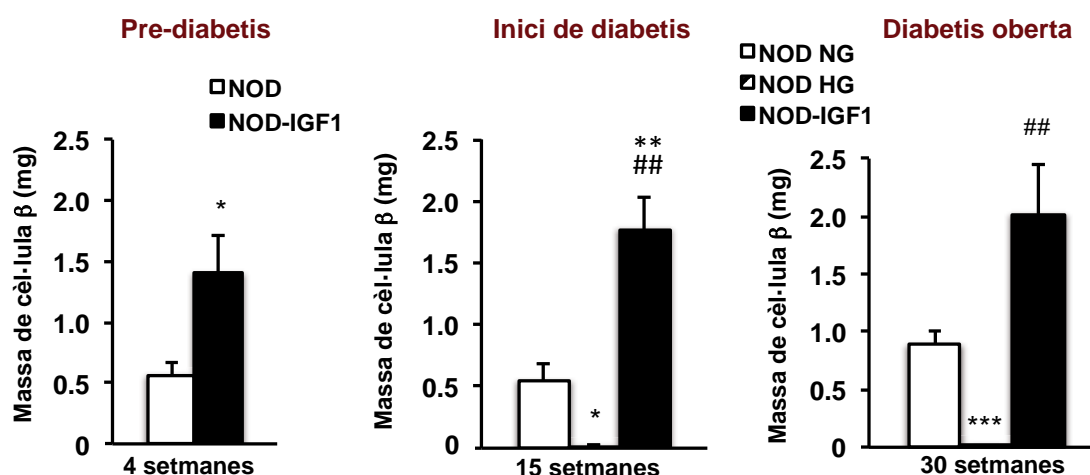


Figura 33. Caracterització de la massa de cèl·lula β . Es va determinar la massa de cèl·lula β pancreàtica dels ratolins NOD i NOD-IGF1 a les 4, 15 i 30 setmanes d'edat mitjançant la quantificació de l'àrea insulina positiva normalitzada per la secció del tall histològic i pel pes del pàncrees. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM. * p <0.05 vs. NOD NG; ** p <0.01 vs. NOD NG, *** p <0.001 vs. NOD NG; ## p <0.01 vs. NOD HG. N= 4-6 animals per grup. NG: Normoglicèmic. HG: Hiperglicèmic.

A les 4 setmanes (pre-diabetis), edat a la qual tots els individus NOD són normoglicèmics, els animals transgènics NOD-IGF1 presentaven una massa de cèl·lula β gairebé 3 vegades superior a la del ratolí NOD (Figura 33). Aquest resultat era coherent amb l'augment en el nombre d'illots per àrea observat anteriorment (Figura 30B).

En la quantificació efectuada a les 15 setmanes (inici de diabetis), es va observar que els ratolins NOD que romanien normoglicèmics mantenien els valors de massa observats a les 4 setmanes d'edat (Figura 33B). En contraposició, els individus NOD hiperglicèmics havien perdut completament la seva massa de cèl·lula β del pàncrees. Aquests resultats concordaven amb la pèrdua d'insulina circulant observada en els animals NOD hiperglicèmics de la mateixa edat (Figura 28A). En canvi, els animals transgènics NOD-IGF1 mostraven una preservació de la massa de cèl·lula β comparable amb els valors obtinguts a les 4 setmanes.

En darrer lloc, es van obtenir resultats similars en la quantificació de la massa de cèl·lula β en estadis més avançats de la malaltia. A les 30 setmanes d'edat (diabetis oberta), els individus transgènics NOD-IGF1 preservaven totalment la massa de cèl·lula β . En canvi, els ratolins NOD hiperglicèmics (que a aquesta edat representen el 70% dels ratolins NOD, veure Figura 22A) havien perdut completament la massa de cèl·lula β del pàncrees (Figura 33). De fet, tant a les 15 com a les 30 setmanes d'edat, en els ratolins NOD hiperglicèmics pràcticament no es detectaven cèl·lules positives per insulina en cap dels tres talls seriatos de pàncrees que van ser analitzats.

Aquests resultats indicaven que els ratolins NOD, a mesura que envellien, perdien la massa de cèl·lula β del pàncrees i la secreció d'insulina i, en conseqüència, esdevenien diabètics oberts. En canvi, aquest procés no es donava en els ratolins transgènics NOD-IGF1 ja que presentaven una preservació de la massa de cèl·lula β amb l'edat. En la Figura 34 es mostra un resum de les dades obtingudes en la quantificació de la massa de cèl·lula β a les diferents etapes de la malaltia.

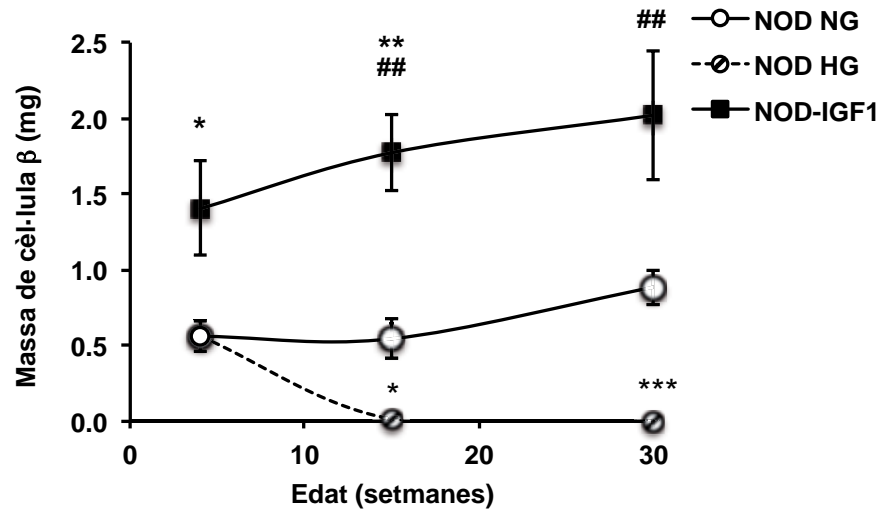


Figura 34. Resum de la quantificació de la massa de cèl·lula β durant l'evolució del procés diabètic (veure Figura 33). Es va determinar la massa de cèl·lula β pancreàtica en els ratolins NOD i NOD-IGF1 a les 4, 15 i 30 setmanes d'edat mitjançant la quantificació de l'àrea insulina positiva normalitzada per la secció del tall histològic i pel pes del pàncrees. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NOD NG; ** $p < 0.01$ vs. NOD NG, *** $p < 0.001$ vs. NOD NG; ## $p < 0.01$ vs. NOD HG. N= 4-6 animals per grup. NG: Normoglicèmic. HG: Hiperglicèmic.

6. CARACTERITZACIÓ DE LA REPLICACIÓ DE LES CÈL·LULES β EN L'ETAPA PRE-DIABETIS

La replicació de les cèl·lules β pre-existents s'ha descrit com el principal mecanisme responsable del manteniment i creixement de la massa de cèl·lula β (Dor et al., 2004; Georgia and Bhushan, 2004; Teta et al., 2007). D'altra banda, IGF-1 és capaç de promoure la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules β (Hogg et al., 1993; Rabinovitch et al., 1982) i està involucrat en la regulació del creixement i diferenciació dels illots (Han et al., 1988; Le Roith, 1997). Per aquest motiu, i amb l'objectiu d'estudiar si un augment en la replicació de la cèl·lula β era el responsable de l'increment de massa de cèl·lula β observat en els ratolins transgènics NOD-IGF1 pre-diabètics, es va determinar la taxa de replicació de les cèl·lules β .

6.1. Determinació de la taxa de replicació mitjançant l'anàlisi histològica del marcador de replicació Ki67

La proliferació de les cèl·lules β va ser analitzada mitjançant una tinció conjunta contra el marcador de proliferació Ki67 (Starborg et al., 1996) i contra insulina en pàncrees d'individus pre-diabètics. S'ha descrit que la proteïna Ki67 s'expressa a nivells baixos durant la fase final del cicle cel·lular G1 i s'acumula durant les fases de S, G2 i M; essent utilitzada en molts casos com a indicador de replicació. Tal i com s'observa en la Figura 35A es van poder detectar nuclis de cèl·lula β en replicació però no es van observar diferències en la taxa de replicació dels illots transgènics NOD-IGF1 en comparació amb els illots NOD control (Figura 35B).

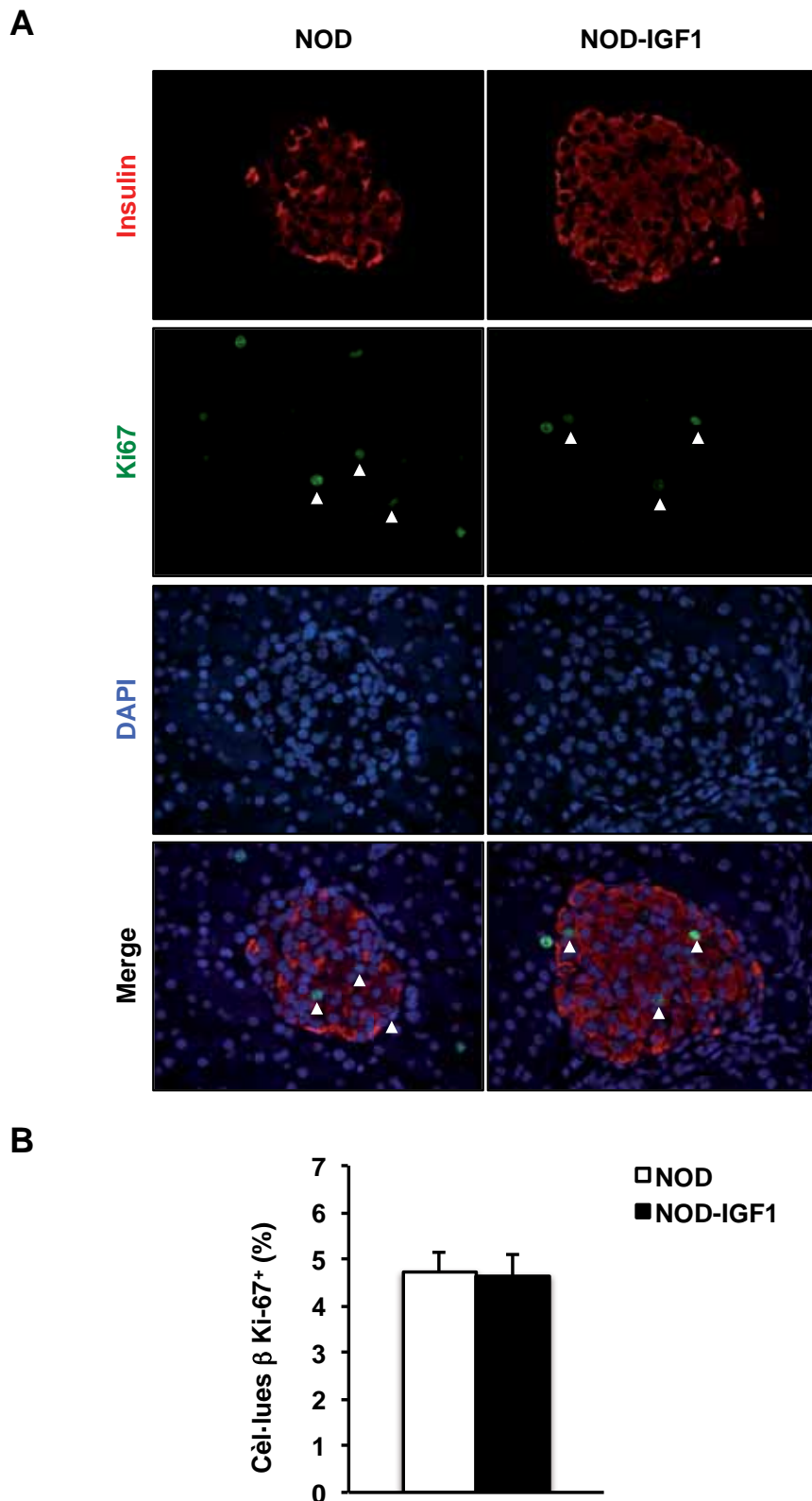


Figura 35. Mesura de la taxa de replicació. (A) Anàlisi immunohistoquímica de la replicació. Es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica contra Ki67 (verd) i contra insulina (vermell) en talls histològics de pàncrees d'animals NOD i animals transgènics NOD-IGF1 normoglicèmics de 4 setmanes d'edat. Fotografies a 400x. **(B) Taxa de replicació.** Es varen comptar tots els nuclis insulina positius continguts en dos talls histològics separats de cada animal (2000-5000 nuclis per animal). Es va representar el percentatge de cèl·lules β positives per Ki67 sobre el total de cèl·lules β recomptades (insulina positives). Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM, n= 5 animals per grup.

6.2. Anàlisi de l'expressió gènica de factors implicats en la regulació del cicle cel·lular

Entre els principals activadors de la progressió de la divisió cel·lular destaquen les quinases dependents de ciclins o Cdks, i les ciclins. En concret, l'activació de la Cdk-4 que actua en complex amb les ciclins D1 i D2 és essencial per a la proliferació post-natal de la cèl·lula β (Kushner et al., 2005; Rane et al., 1999). Per altra banda, existeixen inhibidors del cicle cel·lular, entre els quals es troben els inhibidors de les quinases dependents de ciclina o Cki (p21/cdkn1a, p27/cdkn1b), que són de gran importància com a senyal negativa del creixement cel·lular. Està descrit que la sobreexpressió de p21 podria inhibir el creixement de la cèl·lula β actuant com un fre molecular en la progressió del cicle cel·lular (Cozar-Castellano et al., 2006b).

L'expressió gènica d'aquests marcadors va ser avaluada mitjançant PCR quantitativa en individus pre-diabètics per tal d'estudiar si la sobreexpressió d'IGF-1 a les cèl·lules β dels animals NOD-IGF1 era capaç de modular el cicle cel·lular. No es van detectar canvis en l'expressió gènica de la quinasa dependent de ciclina Cdk-4 ni tampoc en les ciclins D1 i D2 entre els illots dels ratolins NOD i els ratolins transgènics NOD-IGF1 (Figura 36).

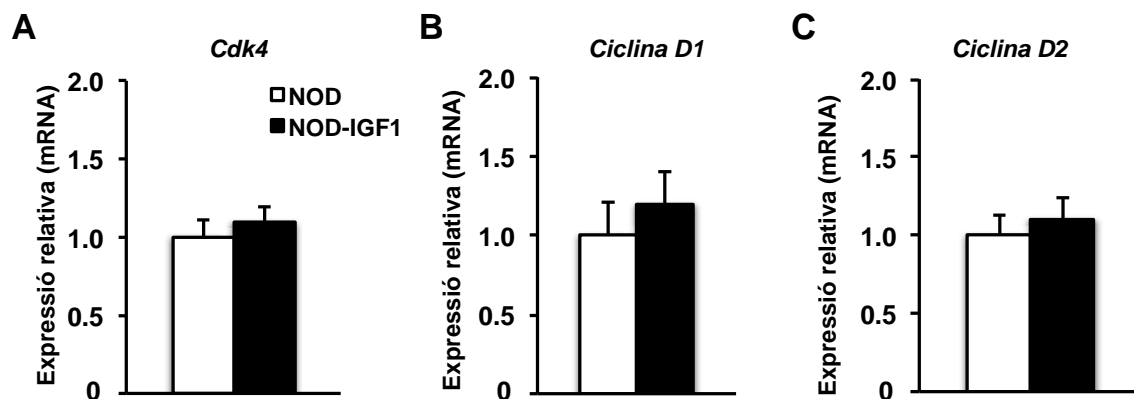


Figura 36. (A-C) Expressió gènica de Cdk-4, ciclina D1 i ciclina D2. Mitjançant PCR quantitativa es va mesurar l'expressió de (A) la quinasa dependent de ciclins Cdk-4, (B) de la ciclina D1 i (C) de la ciclina D2 a partir de RNA d'illots d'animals NOD i NOD-IGF1 de 8 setmanes d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM, N= 9-10 animals per grup.

En canvi, en la quantificació dels nivells d'expressió dels inhibidors del cicle cel·lular es va observar un augment significatiu en l'expressió gènica de p21 (Figura 37A). Pel que fa a p27 no es van detectar canvis en l'expressió gènica d'aquest inhibidor (Figura 37B).

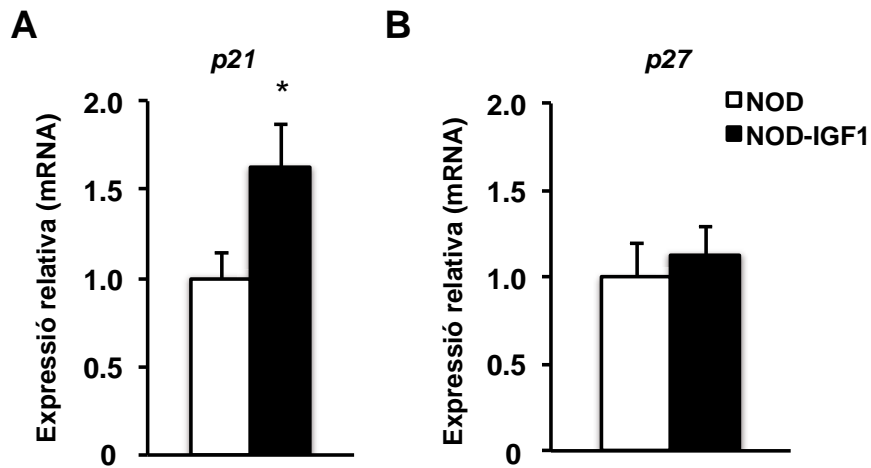


Figura 37. Expressió gènica d'inhibidors del cicle cel·lular. (A-B) Mitjançant PCR quantitativa es va mesurar l'expressió dels inhibidors del cicle cel·lular (A) p21 i (B) p27, a partir de RNA d'illots d'animals NOD i NOD-IGF1 de 8 setmanes d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM, * $p < 0.05$. N= 9-10 animals per grup.

Això indicaria que tot i una possible estimulació de la proliferació de la cèl·lula β induïda per IGF-1, en els illots dels animals transgènics NOD-IGF1 no s'observava un augment de la taxa de replicació ni tampoc de l'expressió gènica de marcadors de proliferació de la cèl·lula β . En contraposició, s'observava un augment de l'inhibidor del cicle cel·lular p21 que podria ser responsable de l'equilibri replicatiu en els illots transgènics.

Aquests resultats concordaven amb els obtinguts en treballs anteriors, on s'havia descrit que la sobreexpressió d'IGF-1 a la cèl·lula β no era capaç d'induir l'increment de replicació de les cèl·lules en ratolins sans (Agudo et al., 2008). En aquest cas, també es va observar un increment de l'inhibidor del cicle cel·lular p21 que podria estar frenant la progressió del cicle cel·lular com a mecanisme compensatori als efectes d'IGF-1 als illots dels animals transgènics.

7. CARACTERITZACIÓ DE LA MORT CEL·LULAR DE LES CÈL·LULES β EN ELS RATOLINS TRANSGÈNICS NOD-IGF1 EN L'ETAPA PRE-DIABETIS

La massa de cèl·lula β és el resultat de l'equilibri entre la mort i la formació de noves cèl·lules β . D'altra banda, l'apoptosi fisiològica de les cèl·lules β ha estat proposada com el fenomen causatiu més primerenc en la diabetis tipus 1. El factor de creixement IGF-1, a més de les seves funcions a nivell de diferenciació i proliferació de la cèl·lula β , també és un potent factor antiapoptòtic. De fet, l'activació del receptor de l'IGF-1 (IGF-1R) promou senyals de supervivència particularment importants (Torres Aleman, 2005). Per tal d'estudiar si la sobreexpressió d'IGF-1 als ratolins NOD-IGF1 actuava com a un factor de supervivència capaç de prevenir la mort de la cèl·lula β es va estudiar aquest paràmetre en els pàncrees dels animals NOD i NOD-IGF1.

7.1. Anàlisi histològica de la taxa d'apoptosi en els illots pancreàtics

La determinació de la taxa d'apoptosi es va realitzar mitjançant la tècnica del TUNEL combinada amb un marcatge contra un còctel de marcadors "no β " de l'illot pancreàtic. Mitjançant aquesta tècnica, els nuclis de les cèl·lules apoptòtiques es detecten per la unió de nucleòtids marcats als fragments trencats del DNA, característica pròpia de les cèl·lules apoptòtiques. En aquest cas, es va observar com els illots dels ratolins transgènics NOD-IGF1 presentaven una reducció significativa del nombre de cèl·lules β apoptòtiques per illot (cèl·lules negatives pel marcatge del còctel i positives per TUNEL) (Figura 38).

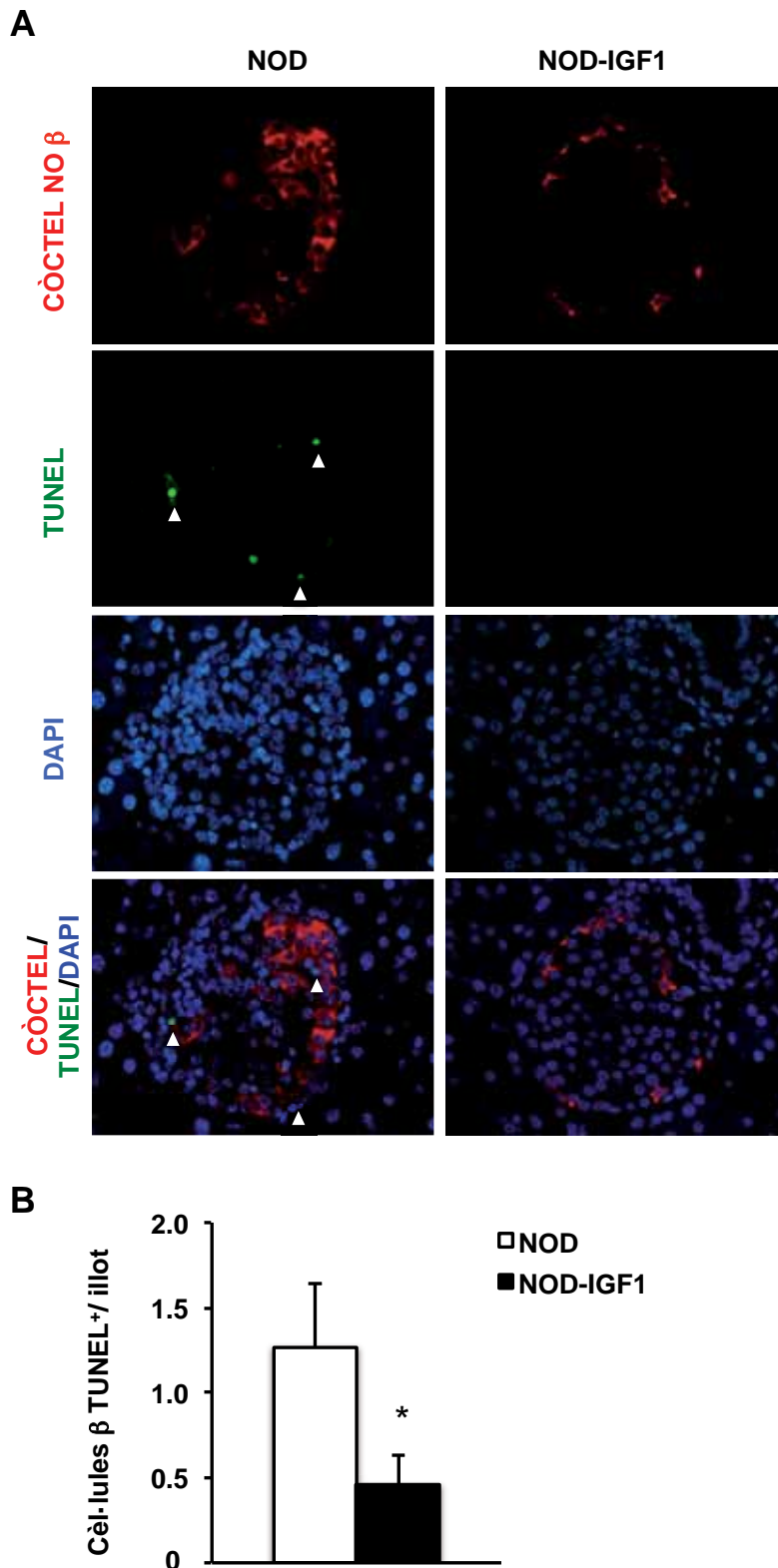


Figura 38. Anàlisi histològica de l'apoptosi en individus pre-diabètics. (A) Immunohistoquímica contra TUNEL. Es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica contra un còctel de marcadors no β (vermell) que inclou anticossos contra glucacó, somatostatina i polipètid pancreàtic, i contra TUNEL (verd). El marcatge es va realitzar en talls histològics del pàncrees de ratlins NOD i NOD-IGF1 normoglicèmics de 8 setmanes. Fotografies a 400x. **(B) Taxa d'apoptosi.** Es va realitzar un recompte del nombre de cèl·lules negatives pel còctel i positives per TUNEL per illot. Un total de 304 illots NOD i 389 illots NOD-IGF1 van ser analitzats. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, * $p < 0.05$. N= 6 animals per grup.

7.2. Estudi de la via de senyalització de la PKB/AKT en els ratolins transgènics NOD-IGF1

Donat que els illots dels animals NOD-IGF1 mostraven una disminució de la mort per apoptosi de les cèl·lules β , es va caracteritzar el paper d'IGF-1 en la regulació de components relacionats amb l'apoptosi cel·lular. L'IGF-1 pot actuar inhibint l'apoptosi a través de diferents vies de senyalització que han estat extensament estudiades. La seva àmplia capacitat protectora fa pensar que els efectes d'IGF-1 estan mediatos a través d'una via de protecció fonamental, com és l'activació de la proteïna AKT/PKB (proteïna quinasa B) per mitjà de la seva fosforilació. L'AKT representa l'enzim principal de la via canònica de supervivència cel·lular *downstream* del receptor de l'IGF-1 (Torres Aleman, 2005; Vincent and Feldman, 2002).

Així, es va examinar l'estat d'activació de la cascada de senyalització del receptor d'IGF-1 mitjançant la quantificació dels nivells d'AKT i AKT fosforilada (P-AKT) per Western Blot. Amb aquesta finalitat es van obtenir extractes de proteïna d'illots de ratolins NOD i de ratolins transgènics NOD-IGF1 pre-diabètics. En els illots transgènics, es va observar un increment, tot i que no va assolir nivells de significació estadística, en els nivells de P-AKT (Figura 39). Aquest resultat indicava que la sobreexpressió d'IGF-1 portava a una major activació de la via de l'AKT. A més, els illots transgènics mostraven un increment en la quantitat d'AKT total (Figura 39), possiblement degut a una sobreestimulació crònica de la via.

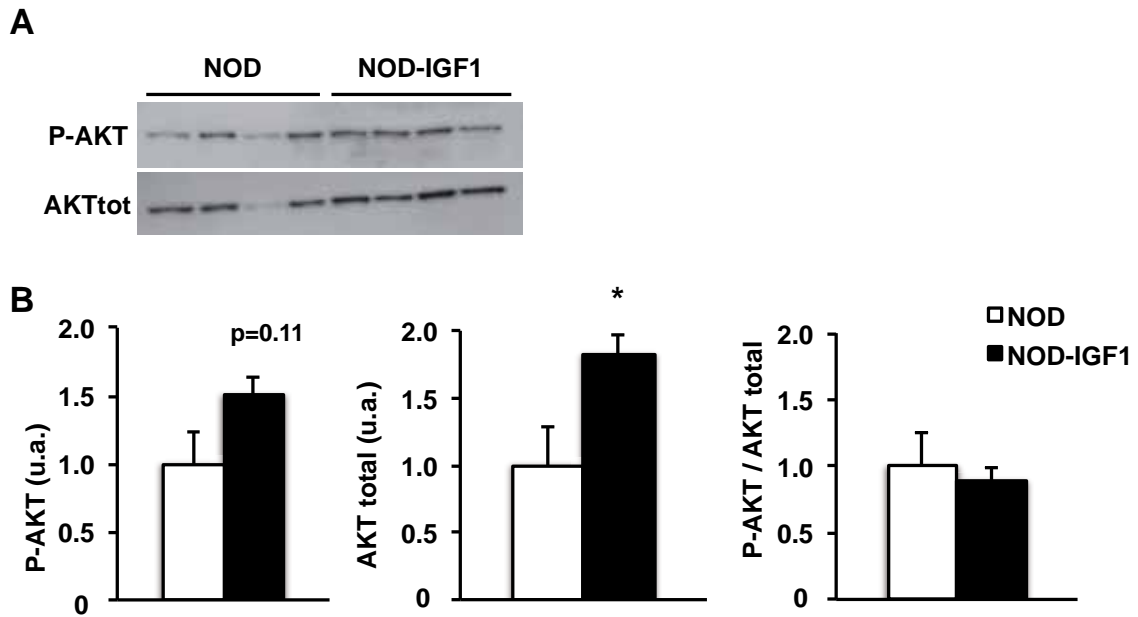


Figura 39. Anàlisi de l'activació de la cascada de senyalització de l'IGF-1R. Determinació dels nivells proteics d'AKT total i P-AKT. Es va determinar la quantitat de proteïna Akt i del seu nivell de fosforilació mitjançant Western Blot d'extractes de proteïna d'illots aïllats de ratolins NOD i NOD-IGF1 de 8 setmanes. Tant AKT com P-AKT corresponien a una banda de 60 KDa. **(A) Imatge de l'immunoblot.** Cada carril correspon a l'extracte de proteïna d'illots d'un individu. **(B) Quantificació de les bandes per densitometria.** Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, * $p < 0.05$. N= 4 animals per grup.

Aquests resultats indicarien que els animals transgènics NOD-IGF1 són capaços de mantenir la massa de cèl·lules β i el seu funcionament gràcies a la prevenció de la mort de les cèl·lules β dels illots promoguda per la sobreexpressió d'IGF-1. En concret, aquest procés podria estar regulat per la via de senyalització de l'AKT, directament relacionada amb la senyalització d'IGF-1.

8. CARACTERITZACIÓ DEL PROCÉS INFLAMATORI EN ELS PÀNCREES DELS ANIMALS TRANSGÈNICS NOD-IGF1

El model diabètic NOD es caracteritza per una progressiva inflamació i infiltració limfocítica dels illots pancreàtics que provoca la mort de la cèl·lula β . Amb l'objectiu de determinar si, a més de prevenir la mort de la cèl·lula β , la sobreexpressió d'IGF-1 era capaç de prevenir la infiltració dels illots mitjançant una modulació del sistema immune o de la resposta inflamatòria, es va dur a terme un estudi d'aquests paràmetres als pàncrees dels ratolins NOD-IGF1 al llarg de l'evolució del procés diabètic.

8.1. Anàlisi histològica del grau d'insulitis en els illots dels animals transgènics NOD-IGF1

L'estudi del grau d'insulitis (infiltració limfocitària) dels illots es va dur a terme mitjançant l'anàlisi histològic dels pàncrees d'individus NOD i NOD-IGF1 al llarg de les diferents etapes d'evolució del procés diabètic (pre-diabetis, inici de diabetis i diabetis oberta). Es va observar que en els ratolins NOD predominava la presència d'illots activament infiltrats per cèl·lules mononuclears que podria explicar la conseqüent destrucció i mort de les cèl·lules β . En canvi, en els pàncrees dels ratolins transgènics NOD-IGF1 hi havia una marcada disminució de la infiltració limfocítica dels illots (Figura 40).

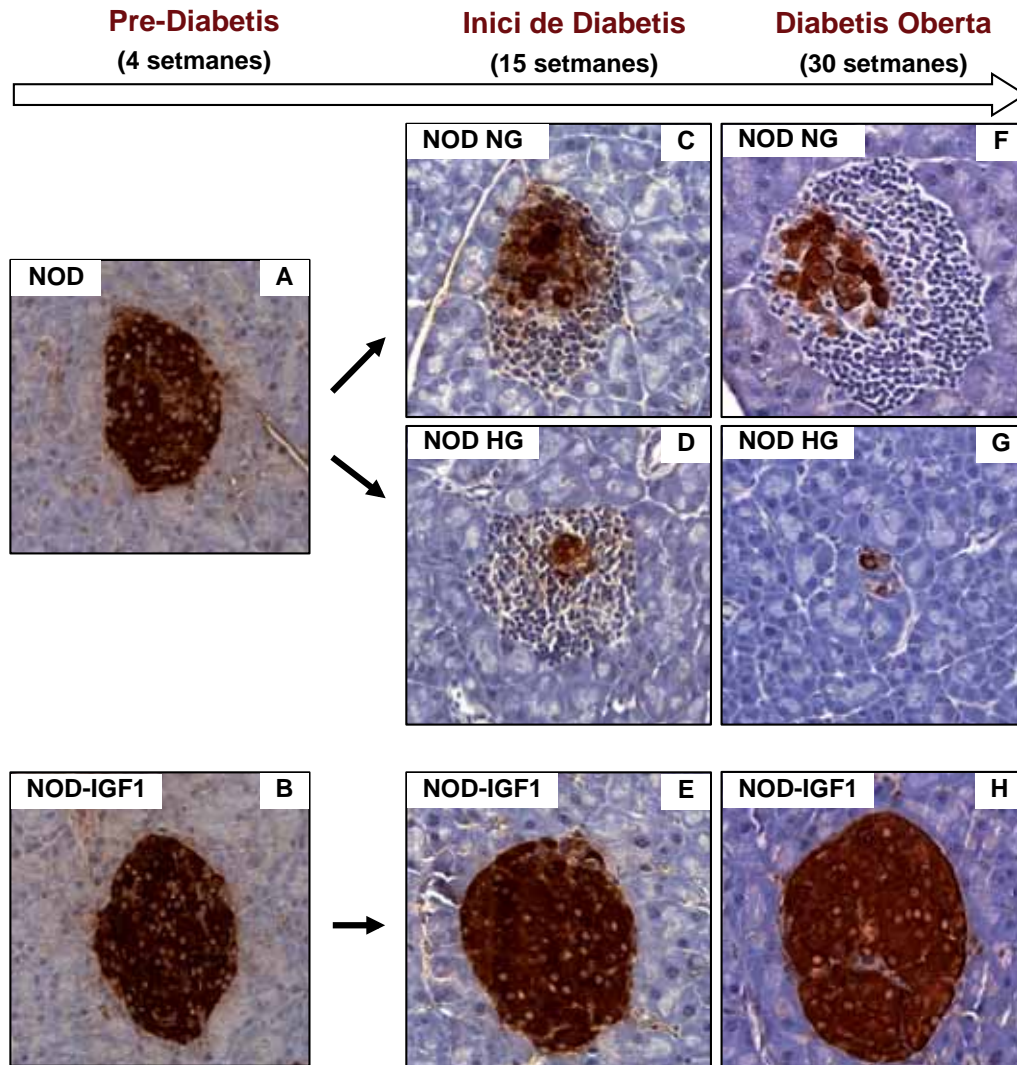


Figura 40. Anàlisi histològica del grau d'infiltració. (A-H) Talls histològics de pàncrees corresponents a animals de 4, 15 i 30 setmanes d'edat van ser tractats amb anticòs anti-insulina per tal d'identificar el grau d'insulinitis dels illots. Fotografies a 400x.

Com es pot observar a les imatges de la Figura 40A,B, a les 4 setmanes d'edat (pre-diabetis) encara no eren evidents a nivell histològic signes d'insulitis en els illots dels animals NOD ni en els NOD-IGF1. En canvi, a les 15 setmanes d'edat, moment en què apareixen els primers casos d'hiperglucèmia en individus NOD (inici de diabetis), s'identificaven illots que presentaven alts nivells d'infiltració en els pàncrees dels ratolins NOD (Figura 40C,D). Per contra, la majoria dels illots dels ratolins NOD-IGF1 continuaven sense presentar infiltració limfocitària (Figura 40E). A les 30 setmanes d'edat (diabetis oberta), els illots dels animals NOD normoglucèmics continuaven presentant una infiltració activa dels illots (Figura 40F). D'altra banda, en els ratolins NOD HG pràcticament no era possible detectar illots insulina positius i l'infiltrat de l'illot havia

desaparegut (Figura 40G). En contraposició a aquests resultats, la majoria dels illots dels ratolins transgènics NOD-IGF1 presentaven una tinció normal contra insulina i continuaven sense mostrar infiltració limfocítica (Figura 40H).

La quantificació del grau d'insulitis a les 15 setmanes va mostrar que només el 16% dels illots en els ratolins NOD normoglicèmics estaven lliures d'insulitis mentre que, en els individus transgènics NOD-IGF1, aquest valor era del 74% dels illots (Figura 41). Donada la dificultat d'identificar un nombre suficient d'illots amb cèl·lules positives per insulina en els animals NOD hiperglicèmics, no es va poder elaborar un perfil del grau d'infiltració per a aquest grup d'animals.

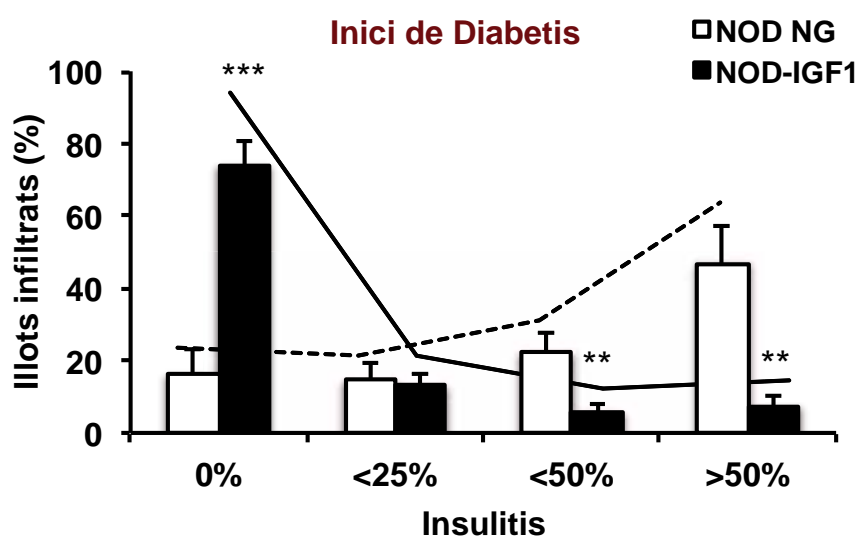


Figura 41. Anàlisi del grau d'insulitis a l'etapa inici de diabetis. Ratolins NOD i NOD-IGF1 de 15 setmanes d'edat van ser sacrificats per analitzar el seu grau d'infiltració limfocitària. Talls histològics del pàncrees es van tenyir amb un anticòs anti-insulina i els illots es van classificar en funció de l'àrea de l'infiltrat en les següents categories: 0%, illot sense infiltració; <25%, illot amb periinsulitis i/o menys del 25% de l'àrea de l'illot infiltrada; <50%, illot amb insulitis, presència de cèl·lules immunitàries en menys del 50% de la superfície de l'illot; >50%, illot amb insulitis severa, més del 50% de l'àrea de l'illot infiltrada. Es van analitzar més de 150 illots per pàncrees. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM; ** p <0.01; *** p <0.001. N= 6-7 animals per grup.

Per tal de quantificar com evolucionava la insulitis amb el temps i confirmar si aquesta disminució de la infiltració de limfòcits en els illots dels animals transgènics NOD-IGF1 es mantenia en fases més avançades de la malaltia, es va analitzar també el grau d'insulitis a les 30 setmanes d'edat dels ratolins (diabetis oberta). Novament, en individus hiperglicèmics era de gran dificultat detectar suficients illots pancreàtics per a elaborar un perfil d'infiltració així que el recompte es va efectuar en ratolins NOD NG i en ratolins NOD-IGF1. L'anàlisi a les 30 setmanes d'edat va mostrar com la insulitis havia empitjorat

marcadament en els ratolins NOD normoglicèmics on la majoria dels illots (>83%) presentaven una infiltració superior al 50% (Figura 42, 40F). En canvi, en els ratolins transgènics NOD-IGF1 s'observava un perfil de insulitis similar a l'obtingut a les 15 setmanes d'edat on la majoria dels illots no van mostrar signes d'infiltració (Figura 42, 40H).

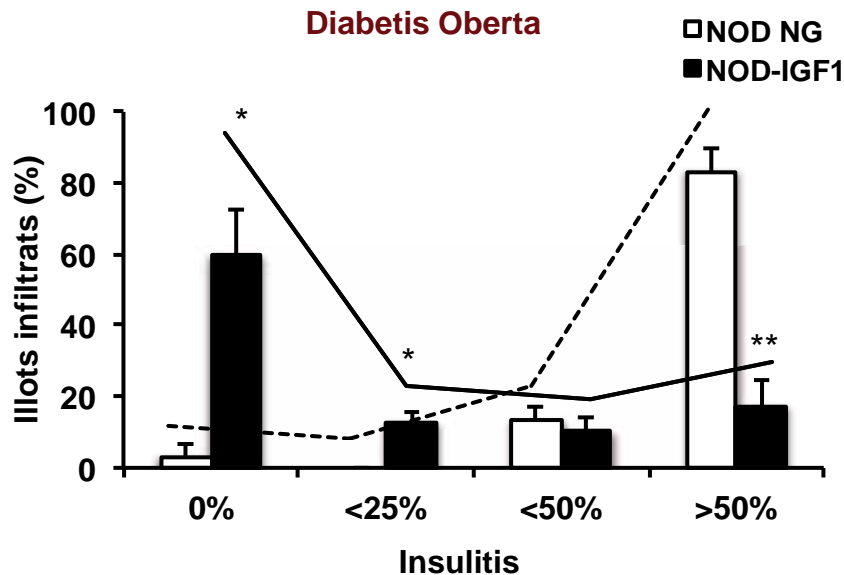


Figura 42. Anàlisi del grau d'insulitis a l'etapa inici de la diabetis. Ratolins NOD i NOD-IGF1 de 30 setmanes d'edat van ser sacrificats per analitzar el seu grau d'infiltració limfocitària. Talls histològics del pàncrees es van tenyir amb un anticòs anti-insulina i els illots es van classificar en funció de l'àrea de l'infiltrat en les següents categories: 0%, illot sense infiltració; <25%, illot amb periinsulitis i/o menys del 25% de l'àrea de l'illot infiltrada; <50%, illot amb insulitis, presència de cèl·lules immunitàries en menys del 50% de la superfície de l'illot; >50%, illot amb insulitis severa, més del 50% de l'àrea de l'illot infiltrada. Es van analitzar més de 150 illots per pàncrees. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. N= 3-4 animals per grup.

8.2. Estudi de l'expressió de citoquines inflamatòries als illots pancreàtics dels animals NOD-IGF1

El desenvolupament d'insulitis i la progressió de la malaltia es correlaciona amb l'expressió de citoquines inflamatòries en els illots pancreàtics. Les citoquines són desencadenants de la infiltració de cèl·lules immunes i, a la vegada, aquests infiltrats produeixen citoquines que estimulen el procés (Anderson and Bluestone, 2005; Rabinovitch and Suarez-Pinzon, 2003). D'aquesta manera, la secreció de determinades citoquines és capaç de modular la funcionalitat de la cèl·lula β i reclutar i activar cèl·lules inflamatòries a l'illot. A més, la mort de cèl·lules β en un illot activament infiltrat estimula un estat d'inflamació i estrès que condueix al reclutament de més cèl·lules del sistema immune innat per actuar en la remodelació del teixit de l'illot.

Així, una vegada quantificada la insulinitis en els animals NOD i NOD-IGF1, el següent pas va ser determinar l'expressió de citocines inflamatòries als illots i avaluar si hi havia un canvi en el perfil d'expressió gènica d'aquestes molècules en els animals transgènics NOD-IGF1. Per fer-ho es van obtenir extractes de RNA d'illots d'individus NOD i NOD-IGF1 a l'inici de la diabetis. Mitjançant la tècnica de la PCR quantitativa es van mesurar els nivells d'expressió de les citocines proinflamatòries més importants: MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10), RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL-2), IFN- γ , TNF- α i IL-1 β . Es va observar que els illots dels animals NOD-IGF1 transgènics presentaven nivells més baixos d'expressió gènica de les citocines inflamatòries examinades (Figura 43).

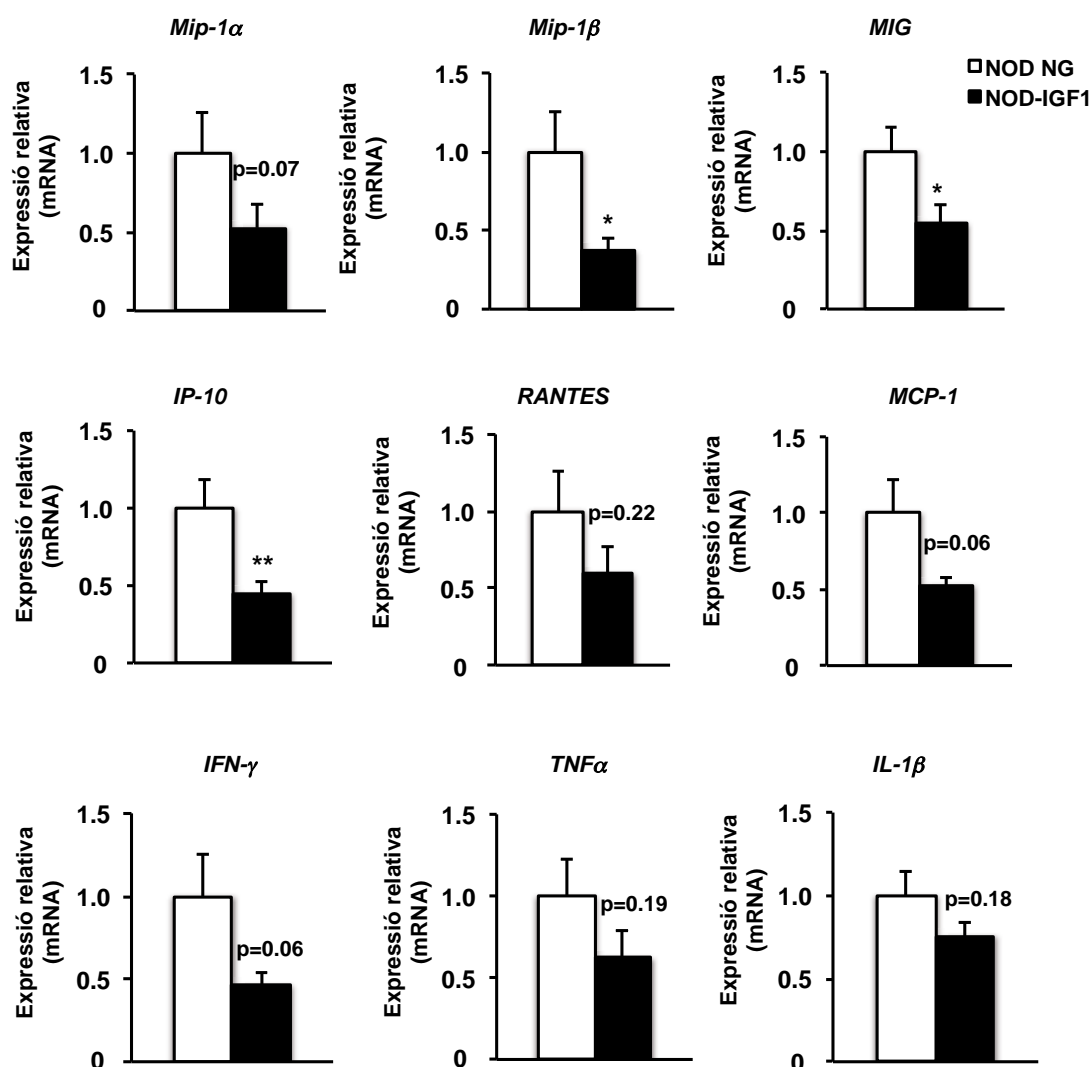


Figura 43. Anàlisi de l'expressió gènica de citocines inflamatòries. Valors expressats en unitats arbitràries equivalents als resultats de la qPCR normalitzats pel gen *Rplp0* i respecte als animals control NOD. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. N= 9-10 animals de 15 setmanes d'edat per grup. NG: Normoglicèmic.

Nivells alts d'expressió intrapancreàtica de MIP-1 α i MIP-1 β durant les etapes inicials d'infiltració de cèl·lules mononuclears a l'illot estan associats a la progressió d'insulitis destructiva en ratolins NOD (Cameron et al., 2000). D'altra banda, IP-10 promou la migració de cèl·lules Th1 activades i tant IP-10 com MIG estan associats a la immunitat i destrucció de les cèl·lules β mitjançada per cèl·lules T. Pel que fa a RANTES, s'expressa amb l'activació de cèl·lules T i la seva senyalització està associada al tipus de resposta immunitària de perfil Th1. A més, les cèl·lules Th1 produeixen citocines proinflamàtiques com IFN- γ , TNF- α o IL-1 β que tenen un efecte citotòxic contra la cèl·lula β i ajuden a promoure la resposta immune cel·lular (Bradley et al., 1999; Kawasaki et al., 2004).

En conjunt, una menor expressió de les citocines citades en els illots dels animals transgènics NOD-IGF1 resultaria en una menor estimulació del procés d'insulitis dels illots que afavoriria el manteniment de la supervivència i la funcionalitat de les cèl·lules β . En canvi, en els illots dels animals NOD, la presència de citocines i de cèl·lules immunes reclutades per aquesta expressió incrementada de citocines pro-inflamatòries portarien a la progressió de la insulitis, pèrdua de massa de cèl·lula β i disfunció del pàncrees endocrí. A més, la mort de les cèl·lules β en els illots NOD contribuiria a incrementar la inflamació del teixit de manera que les cèl·lules apoptòtiques reclutarien macròfags que incrementarien la producció de citocines.

8.3. Estudi de l'expressió de molècules presentadores d'antigen als illots pancreàtics dels animals NOD-IGF1

A part dels reclutament que exerceixen les citocines pro-inflamatòries, per a l'estimulació de les cèl·lules T del sistema immunitari i la generació de cèl·lules específiques per a un antigen determinat, és necessari que l'antigen sigui presentat a les cèl·lules T mitjançant la unió a un complex major d'histocompatibilitat o MHC. De fet, la infiltració dels illots es correlaciona, en alguns casos, amb la hiperexpressió de MHC de classe I, de classe II i de molècules d'adhesió (ICAM-1, LFA-3) tant en els illots com a nivell endotelial (Bottazzo et al., 1985; Foulis, 1987; Foulis and Farquharson, 1986; Foulis et al., 1987; Somoza et al., 1994).

Per tal de valorar els nivells d'expressió d'aquestes molècules, es van determinar mitjançant PCR quantitativa els nivells d'expressió del gen H2-Aa, que codifica per la cadena α del MHC-II, i els nivells d'expressió de la molècula β 2-microglobulina, que codifica per una de les cadenes que constitueixen el MHC-I, en mostres d'illots d'animals a l'inici de la diabetis (Figura 44).

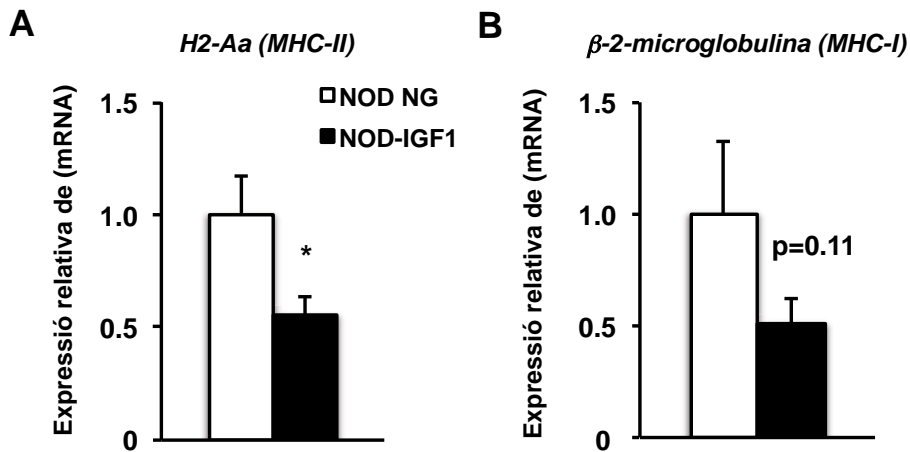


Figura 44. Anàlisi de l'expressió gènica de les molècules presentadores d'antigen. (A) Expressió relativa dels nivells de mRNA del gen *H2-Aa* en illots. **(B)** Expressió relativa dels nivells de mRNA del gen β 2-microglobulina en illots. Valors expressats en unitats arbitràries equivalents als resultats de la qPCR normalitzats pel gen *Rplp0* i respecte els animals control NOD. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM; * $p < 0.05$. N= 7-8 animals de 15 setmanes per grup. NG: Normoglicèmic.

Els resultats obtinguts van mostrar una reducció en l'expressió dels complexos MHC-I i MHC-II en els illots dels animals transgènics NOD-IGF1 que, d'acord amb els resultats anteriors, indicaria una menor estimulació del sistema immune en aquests animals. La menor expressió gènica de H2-Aa detectada en els illots dels individus transgènics NOD-IGF1 (Figura 44A) podria explicar-se per la disminució del grau d'insulitis dels illots observada en aquests animals i, per tant, la menor presència de cèl·lules professionals presentadores d'antígens. La tendència a una disminució d'aproximadament el 50% d'expressió de β 2-microglobulina en els animals NOD-IGF1 (Figura 44B) podria indicar una menor expressió de MHC-I en les cèl·lules β dels illots. En conseqüència, aquestes cèl·lules β , que sobreexpressen IGF-1, serien menys visibles pel sistema immune i, per tant, podrien escapar de l'atac autoimmunitari. De fet, altres treballs han relacionat el paper d'IGF-1 amb l'evasió del sistema immune en diferents línies cel·lulars, on la inhibició de l'expressió d'IGF-1 té lloc de manera coordinada amb l'augment de MHC-I a la superfície de les cèl·lules tractades (Ly et al., 2000; Upegui-Gonzalez et al., 1998). En concordància, quan IGF-1 és co-expressat a la cèl·lula β d'animals transgènics RIP-1/IFN- β , un model que sobreexpressa MHC-I, també s'observa una marcada reducció dels nivells d'expressió de β 2-microglobulina, en paral·lel amb una reducció de la infiltració limfocítica dels illots (Casellas et al., 2006).

D'altra banda, cal una segona senyal estimuladora per a l'activació dels limfòcits T, a més de la senyal proporcionada pel reconeixement específic de l'antigen presentat pel MHC. Aquesta senyal està proporcionada per les molècules co-estimuladores B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86) en la cèl·lula presentadora de l'antigen. L'expressió del mRNA d'aquestes molècules també va ser examinada en mostres d'illots d'animals NOD i NOD-IGF1 a l'inici de la diabetis. Es va observar que els illots dels animals NOD-IGF1 presentaven menor expressió de les molècules co-estimuladores B7.1 i B7.2 (Figura 45).

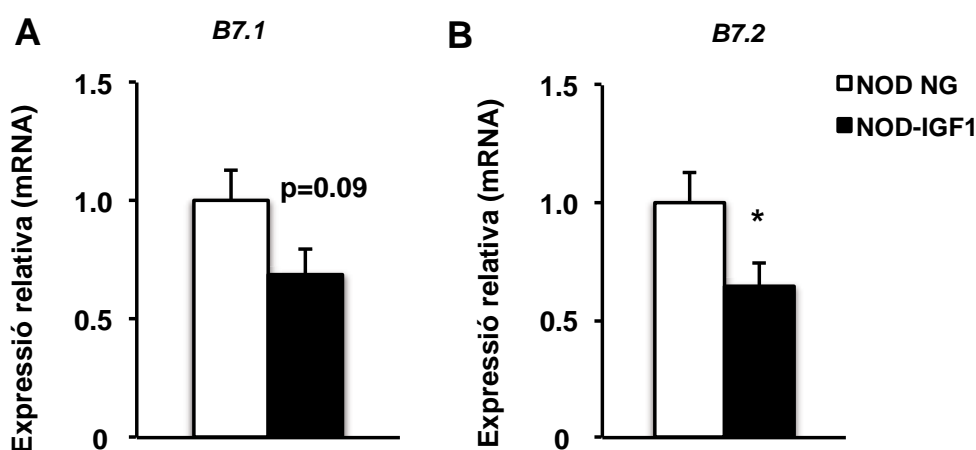


Figura 45. Anàlisi de l'expressió gènica de les molècules coestimuladores B7. (A) Expressió relativa dels nivells de mRNA de B7.1 (CD80) en illots. (B) Expressió relativa dels nivells de mRNA de B7.2 (CD86) en illots. Valors expressats en unitats arbitràries equivalents als resultats de la qPCR normalitzats pel gen *Rplp0* i respecte els animals control NOD. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM; * $p < 0.05$. N= 7-8 animals de 15 setmanes per grup. NG: Normoglicèmic.

Aquests resultats suggereixen que els alts nivells intracel·lulars d'IGF-1 en els illots transgènics NOD-IGF1 podrien reduir l'expressió de MHC de classe I així com l'expressió de les molècules co-estimuladores B7.1 i B7.2 a les cèl·lules β . Això podria resultar en un nivell de presentació d'antígens per sota del llindar necessari per induir el reconeixement immune i, d'aquesta manera, els illots transgènics podrien escapar de la massiva infiltració observada en els animals NOD.

9. DETERMINACIÓ DE SUBPOBLACIONS LIMFOCITÀRIES MITJANÇANT CITOMETRIA DE FLUX

Un altre aspecte important en el desenvolupament i la progressió de la diabetis en la soca NOD és el paper que hi juguen els mecanismes centrals i perifèrics de tolerància. S'ha descrit que en el model NOD, així com en altres models de diabetis tipus 1, la majoria de respostes immunitàries que tenen lloc en l'infiltrat dels illots estan mediades per cèl·lules T. En concret, es pensa que la població de cèl·lules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ó cèl·lules T reguladores (Treg) juga un paper central en el control de les activitats patogèniques (Anderson and Bluestone, 2005; Bluestone and Abbas, 2003; Bluestone et al., 2008). S'ha descrit que les cèl·lules Treg tenen la capacitat de controlar els processos autoimmunes fisiològics, com la diabetis autoimmune, i que variacions en la proporció de Tregs a nivell perifèric regulen la progressió de la malaltia (Belghith et al., 2003). Les cèl·lules Treg presenten la capacitat d'inhibir l'expansió clonal T i la producció de citoquines de les cèl·lules T citotòxiques inhibint directament l'agressivitat d'un procés d'insulitis al pàncrees. A més, les cèl·lules Treg poden funcionar prevenint l'inici de la reacció autoimmune en el nòdul limfàtic o subseqüentment en l'òrgan diana on s'està produint la reacció immune (el pàncrees).

9.1. Anàlisi del percentatge de cèl·lules T reguladores

La disminució de la insulitis observada en els illots dels animals NOD-IGF1 així com la menor expressió gènica de citoquines inflamatòries podria estar regulada, a més, per un increment en la població o funcionalitat de les cèl·lules Treg. Amb l'objectiu d'aprofundir en l'estudi dels mecanismes immunològics involucrats en la protecció de l'atac autoimmune dels illots NOD-IGF1 es va quantificar el percentatge de cèl·lules Treg presents en els nòduls limfàtics pancreàtics (PLN), en el pàncrees i en la melsa d'animals pre-diabètics NOD i NOD-IGF1 (Figura 46). La quantificació es va dur a terme mitjançant un protocol d'aïllament de leucòcits per a cada teixit (especificat a l'apartat de Material i Mètodes), i el seu posterior anàlisi per citometria de flux.

Tot i que les diferències observades no van assolir significació estadística, els resultats van mostrar un modest increment en el % de Tregs als PLNs i un increment d'aproximadament 2.5 vegades en les Treg intrapancreàtiques dels animals transgènics NOD-IGF1. En canvi, no es van detectar canvis a nivell esplènic (Figura 46).

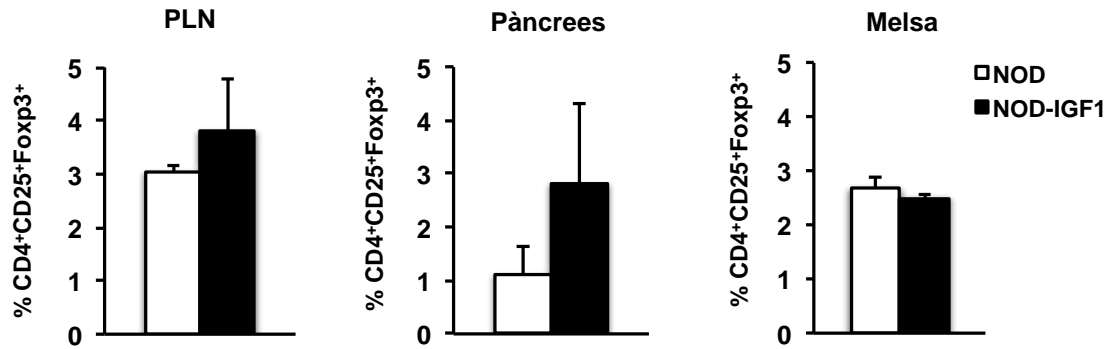


Figura 46. Anàlisi del percentatge de població Treg als teixits: nòduls limfàtics del pàncrees, pàncrees i melsa en animals pre-diabètics. Percentatge de cèl·lules Treg CD4+CD25+Foxp3+ mesurat per citometria de flux en animals de 8 setmanes d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM, N= 3 animals per grup. PLN: Nòduls limfàtics pancreàtics.

Aquests resultats podrien suggerir una possible contribució, a nivell local, de la població de cèl·lules Treg en la prevenció del desenvolupament de diabetis en els animals que sobreexpressen IGF-1. Un major percentatge de cèl·lules CD4+CD25+FoxP3+ al pàncrees dels ratolins transgènics podria significar una millora en la tolerància local als antígens de la cèl·lula β dels illots NOD-IGF1. L'expressió de citoquines pro-inflamatòries per part de les cèl·lules T efectores també es veuria suprimida per les cèl·lules Treg i, en conseqüència, hi hauria una menor migració de cèl·lules inflamatòries als illots pancreàtics i, per tant, menys insulinitis.

Així doncs, la protecció contra el desenvolupament de T1D en els ratolins transgènics NOD-IGF1 resultaria de la sinergia entre diferents mecanismes, com la prevenció de l'apoptosi en la cèl·lula β , la menor presentació d'antígens al sistema immune, i l'augment de la població de Treg al pàncrees que en conjunt protegrien la destrucció autoimmune de la cèl·lula β . Tots aquests resultats suggerien que la sobreexpressió d'IGF-1 als illots pancreàtics podria ser una aproximació terapèutica indicada per frenar i prevenir l'atac autoimmune dels illots i promoure la supervivència de la cèl·lula β durant el procés diabètic.

Part II:
***Aproximació de teràpia gènica dirigida al pàncrees
basada en la transferència d'IGF-1 per contrarestar
la diabetis autoimmune en el ratolí NOD***

1. ANTECEDENTS

Els resultats obtinguts en els ratolins transgènics NOD-IGF1, exposats en la Part I d'aquest treball, així com els estudis del nostre grup en altres models de diabetis tipus 1 que sobreexpressaven IGF-1 al pàncrees (Casellas et al., 2006; George et al., 2002) indicaven que l'expressió local d'IGF-1 podria ser una aproximació segura per a protegir el pàncrees endocrí enfront el desenvolupament de diabetis. Així IGF-1 seria un possible gen terapèutic candidat al desenvolupament d'estratègies de teràpia gènica per la diabetis.

Els vectors virals adenoassociats (AAV) han mostrat ser una eina molt eficient per a la transferència i expressió a llarg termini de gens a pàncrees. En un estudi publicat pel nostre laboratori on es van comparar els serotips AAV6, AAV8 i AAV9 en l'eficiència de transducció del pàncrees d'animals ICR mitjançant les administracions intravenosa i intraductal, es va determinar el serotip AAV8 i la via d'administració intraductal com la combinació més eficient per a la transducció del pàncrees endocrí i exocrí (Jimenez et al., 2011).

Per tant, en la Part II dels resultats d'aquesta tesi doctoral es van utilitzar vectors AAV8 administrats intraductalment per a la transferència del gen candidat *Igf-1* al pàncrees d'animals NOD pre-diabètics. Posteriorment es va fer un seguiment dels animals tractats per tal de determinar si l'expressió d'IGF-1 mitjançada pel vector AAV era capaç de prevenir el desenvolupament espontani de diabetis en la soca NOD.

2. INFECTIVITAT I TROPISME DEL VECTOR AAV8 AL PÀNCREES DE RATOLINS NOD PRE-DIABÈTICS

La majoria dels estudis de tropisme dels vectors AAV han estat realitzats en individus mascles adults de soques de ratolins sans (ICR, BALB/C, C57Bl/6, etc.). En canvi, el desenvolupament d'una estratègia de prevenció de diabetis en un model espontani com el model NOD, requereix la transferència gènica de candidats terapèutics a individus femella joves. Tal i com s'ha observat en els resultats de la part I d'aquest treball així com en d'altres articles de la bibliografia (Rosmalen et al., 2002), a les 4 setmanes d'edat els ratolins NOD encara preserven la massa de cèl·lula β , que es troba lliure d'insulitis. És a partir d'aquesta edat que s'inicia el procés d'infiltració dels illots i la pèrdua massiva de cèl·lules β que culmina en l'aparició de la malaltia. Per tant, les 4 setmanes d'edat seria un moment convenient per a l'administració a femelles NOD de gens candidats a preservar la massa de cèl·lula β , com l'IGF-1.

2.1. Anàlisi de la transducció del vector AAV8 administrat localment a femelles NOD de 4 setmanes

Per tal de confirmar la transducció per part del vector viral AAV8 al pàncrees d'individus femella NOD de 4 setmanes d'edat, es va realitzar una injecció intraductal de vectors AAV8 codificants per la proteïna verda fluorescent GFP sota el control del promotor CAG (promotor híbrid basat en el promotor de la β -actina de pollastre i l'*enhancer* del Citomegalovirus) (AAV8-CAG-GFP) a una dosi de 1.4×10^{12} genomes virals. Al cap d'un mes post-injecció es van sacrificar els animals i es va examinar la transducció de diversos teixits (Figura 47).

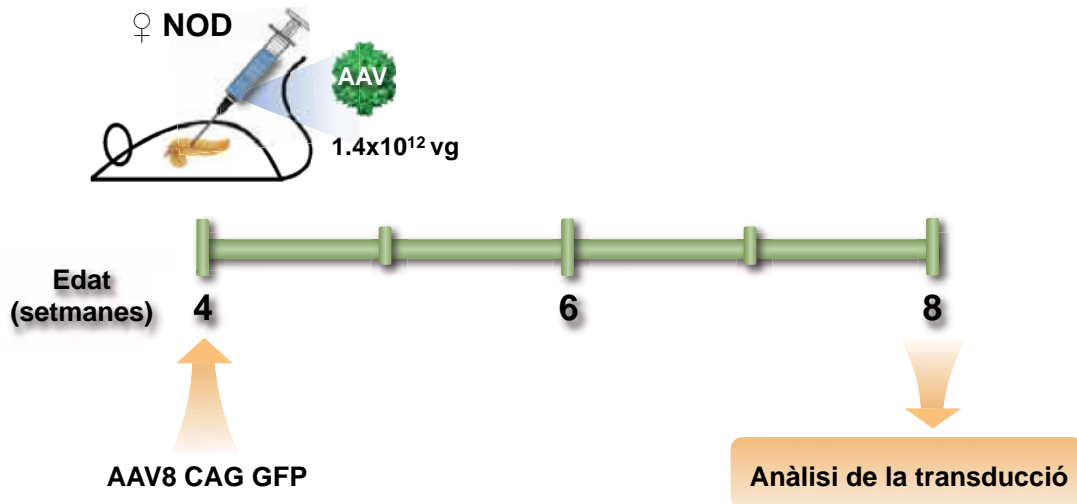


Figura 47. Disseny experimental. Injecció intraductal del vector AAV8-CAG-GFP: vector AAV de serotip 8 codificant per la proteïna verda fluorescent GFP sota control del promotor CAG (promotor híbrid basat en el promotor de la β -actina de pollastre i l'*enhancer* del Citomegalovirus).

2.1.1. Transducció del pàncrees

Es va observar que les femelles NOD injectades localment al pàncrees amb el vector AAV8-CAG-GFP presentaven una transducció eficient de les cèl·lules β dels illots així com una àmplia distribució del vector en el teixit exocrí del pàncrees (Figura 48), tal i com havíem descrit anteriorment en altres models animals (Jimenez et al., 2011). La transducció dels illots pancreàtics es va examinar mitjançant una doble tinció immunohistoquímica contra GFP i contra insulina (Figura 48A). A més, es va observar que la dosi administrada va permetre la transducció majoritària de la perifèria de l'illot però també de cèl·lules pròximes al *core*.

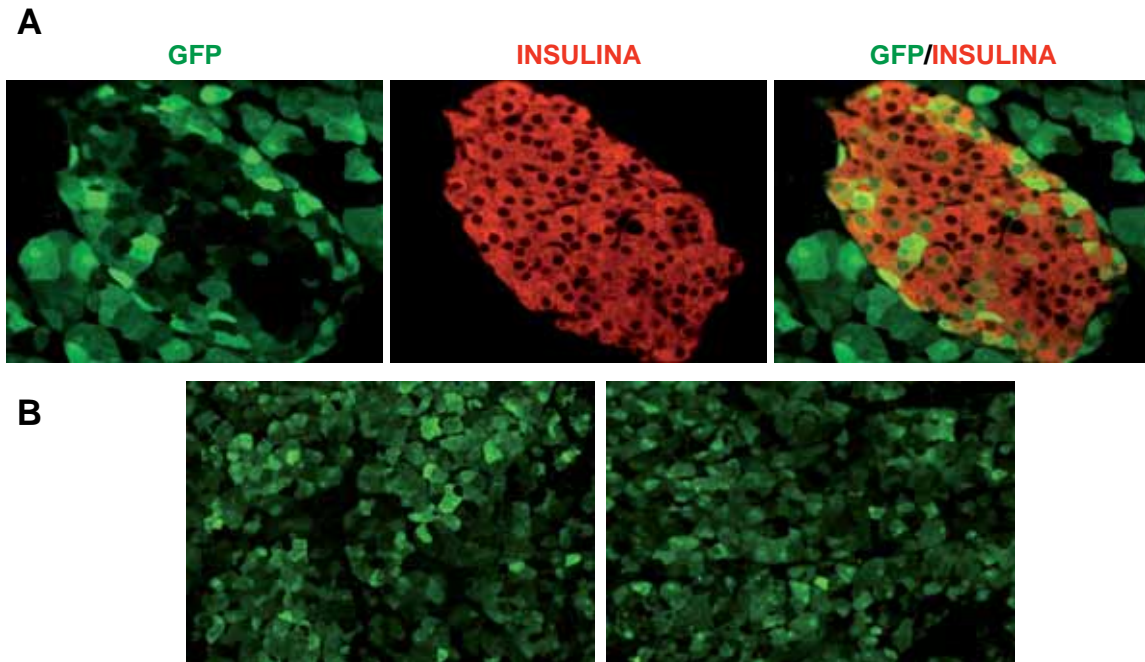


Figura 48. Transducció del pàncrees de femelles NOD administrades intraductalment amb el vector AAV8-CAG-GFP. Immunohistoquímica del pàncrees contra GFP (verd) i insulina (vermell) en mostres d'animals injectats intraductalment a les 4 setmanes d'edat amb 1.4×10^{12} genomes virals i sacrificats 1 mes després. **(A) Transducció de les cèl·lules β dels illots.** Fotografies a 400x. **(B) Transducció del pàncrees exocrí.** Dues imatges representatives de la immunohistoquímica del pàncrees exocrí contra GFP. Fotografies a 200x.

2.1.2. Transducció d'altres teixits perifèrics

S'ha descrit que quan els vectors AAV8 són administrats localment al pàncrees mitjançant una injecció intraductal, una part de la càrrega de vector viral administrada és capaç d'assolir la circulació sistèmica i transduir teixits diferents del pàncrees, principalment el fetge i el cor (Jimenez et al., 2011). Així doncs, l'ús de promotors ubics com el promotor CAG, permet que el constructe contingut en el vector AAV8 s'expressi també al fetge i al cor dels animals injectats intraductalment.

L'anàlisi histològic d'aquests teixits en les femelles NOD injectades amb el vector AAV8-CAG-GFP va confirmar l'expressió de la proteïna verda fluorescent GFP a fetge i cor. Es va observar transducció dels hepatòcits, majoritàriament situats al voltant de les vènules centrals al fetge, i de les cèl·lules musculars cardíques (Figura 49).

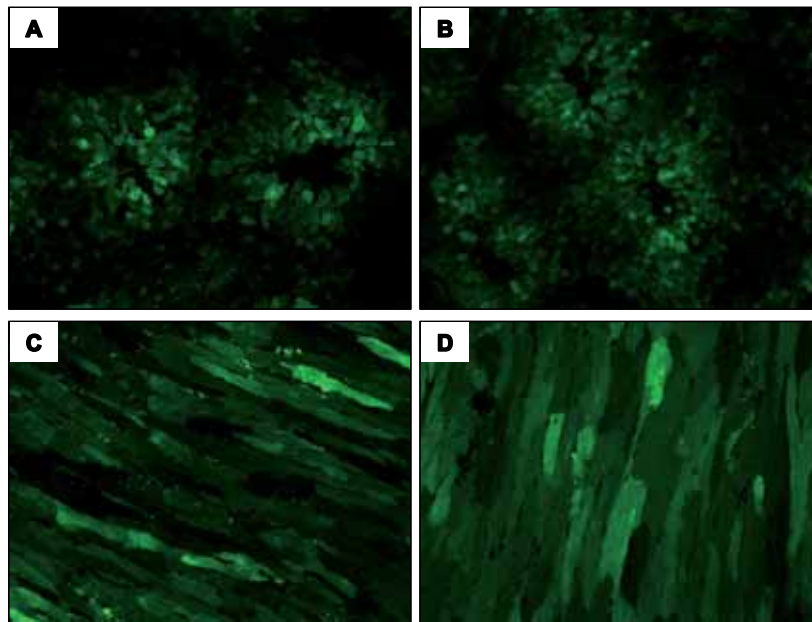


Figura 49. Transducció al fetge i al cor de femelles NOD administrades intraductalment amb el vector AAV8-CAG-GFP. Animals injectats intraductalment a les 4 setmanes d'edat amb 1.4×10^{12} genomes virals i sacrificats 1 mes després. **(A,B)** Immunohistoquímica del fetge contra GFP. Fotografies a 100x. **(C,D)** Immunohistoquímica del cor contra GFP. Fotografies a 200x.

2.2. Modulació del tropisme de vectors AAV mitjançant l'ús de seqüències diana de microRNAs

A l'hora de dissenyar una estratègia per a transferir gens terapèutics com l'*Igf-1* al pàncrees mitjançant l'ús de vectors AAV8, és important dirigir l'expressió del transgèn al teixit diana i minimitzar l'expressió ectòpica en altres teixits. Tot i que l'administració localitzada de vectors AAV8 resulta en una transducció molt eficient del pàncrees exocrí i endocrí dels animals NOD, el fetge i el cor dels individus injectats també resulten transduïts. Una manera d'aconseguir que l'expressió del transgèn dirigida pel vector AAV8 estigui limitada a tipus cel·lulars específics del pàncrees, és l'ús de promotors específics de teixit. No obstant, l'expressió dirigida per aquest tipus de promotors és més dèbil en comparació amb promotors d'origen viral com el CAG i depèn, en molts casos, de la pròpia regulació del teixit. A més, davant l'atac autoimmune i destrucció selectiva de les cèl·lules β dels illots NOD, la transducció del pàncrees exocrí seria convenient ja que les cèl·lules acinars podrien continuar proporcionant el factor terapèutic de manera paracrina a les cèl·lules β restants.

Una alternativa disponible per a restringir l'expressió del transgèn al teixit d'interès és l'ús de la tecnologia dels microRNAs (miRNAs). Els miRNAs són petits RNAs no

codificants, que tenen un paper regulador en el silenciament de gens a nivell post-transcripcional. En la seva forma madura, s'uneixen específicament a determinats mRNAs mitjançant el reconeixement de seqüències diana ubicades en la part 3'-UTR (untranslated region) que són total o parcialment complementàries al miRNA i inhibeixen la seva expressió. Així, l'expressió gènica del constructe contingut en el vector AAV es pot modular post-transcripcionalment mitjançant el sistema endogen de miRNAs específics de teixit. Per inhibir l'expressió del transgèn en els teixits no desitjats cal incorporar la seqüència diana d'un miRNA (miRT) específic d'aquell teixit en la regió 3'-UTR del constructe AAV (Kelly and Russell, 2009).

Estudis sobre el perfil d'expressió dels miRNAs han revelat l'existència de miRNAs que són altament expressats de manera selectiva en un teixit (Shingara et al., 2005). Entre ells es troba el miRNA específic de fetge miR-122a (Chang et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002), i el miRNA específic de cor miRNA-1 (Shingara et al., 2005). De fet, en el nostre laboratori les seqüències diana dels miRNAs 122a i 1 ja han estat emprades en constructes AAV i han demostrat bloquejar de manera molt eficient l'expressió a fetge i a cor (Jimenez et al., 2013).

2.2.1. Anàlisi de l'expressió del microRNA-122a al fetge dels ratolins NOD

Per tal de validar la incorporació de la seqüència diana del microRNA-122a (miRT-122a) en el constructe AAV com a estratègia per a bloquejar l'expressió del transgèn al fetge dels individus NOD, es va comprovar l'expressió d'aquest microRNA en ratolins femella NOD. Aquest estudi es va realitzar en individus pre-diabètics (normoglicèmics) i en individus en la fase de diabetis oberta (hiperglicèmics) per estudiar si hi havia canvis en l'expressió hepàtica del miR-122a durant l'avenç progressiu de la malaltia. A més, es va analitzar també l'expressió endògena del miR-122a en el pàncrees dels ratolins NOD per descartar una possible interferència en l'expressió del transgèn en aquest teixit, degut a la presència de la seqüència diana del miR-122a al constructe AAV.

Tal i com s'esperava, només es va detectar expressió del miR-122a en el fetge dels animals NOD. A més, es va observar que el nivells d'expressió hepàtica de miR-122a eren superiors en els animals NOD diabètics en comparació amb els individus pre-diabètics, tot i que les diferències no van assolir significació estadística (Figura 50). Això podria ser degut al paper del miR-122a en el metabolisme lipídic hepàtic (Esau et al., 2006), que es troba alterat en els animals NOD hiperglicèmics (Figura 28). En qualsevol cas, això

semblava indicar que tot i l'avenç del procés diabètic en els ratolins NOD, el bloqueig de l'expressió del constructe AAV en el fetge es mantindria, o fins i tot augmentaria. En canvi, no es van obtenir nivells detectables d'expressió de miR-122a en el pàncrees, independentment de l'estadi diabètic de l'animal.

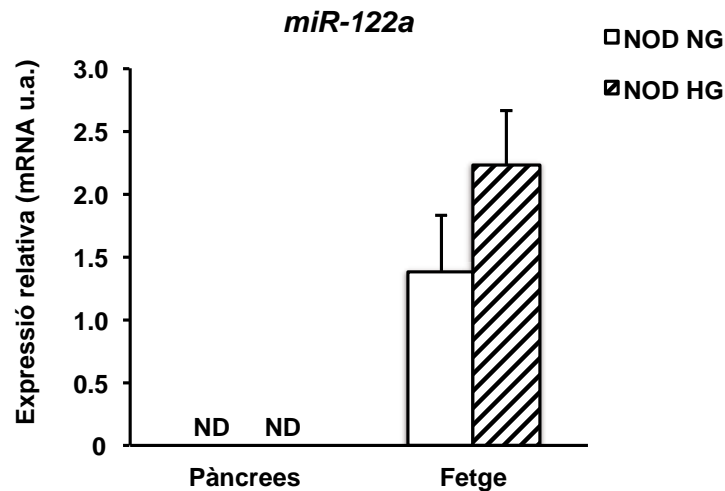


Figura 50. Quantificació de l'expressió del microRNA-122a a pàncrees i a fetge. Els nivells d'expressió del microRNA-122a (miR-122a) es van quantificar mitjançant qPCR en mostres de pàncrees i de fetge d'individus NOD femella. Es van analitzar animals normoglicèmics (NG) de 8 setmanes d'edat i animals hiperglicèmics (HG) de 24 setmanes d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM, N= 4-6 animals per grup. ND: No detectat. u.a.: unitats arbitràries.

2.2.2. Anàlisi de l'expressió del microRNA-1 al cor dels ratolins NOD

De la mateixa manera, per tal de validar l'ús de la seqüència diana del microRNA-1 (miRT-1) com a estratègia per a bloquejar l'expressió del transgèn contingut en el constructe AAV al cor dels individus NOD, es va comprovar l'expressió d'aquest microRNA en ratolins femella NOD pre-diabètics (normoglicèmics) i en la fase de diabetis oberta (hiperglicèmics). A més, es va analitzar també l'expressió del miR-1 al pàncrees dels ratolins per descartar una possible interferència de l'expressió del transgèn en aquest teixit. Els resultats obtinguts van mostrar com el miR-1 era expressat al cor dels animals NOD i en valors similars independentment de l'estadi diabètic dels animals. Pel que fa al pàncrees, no es va detectar expressió del miR-1 per a cap de les condicions (Figura 51).

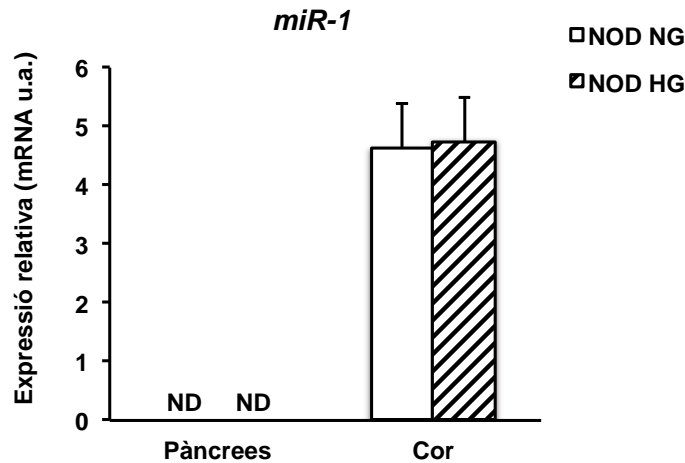


Figura 51. Quantificació de l'expressió del microRNA-1 en el pàncrees i en el cor. Els nivells d'expressió del microRNA-1 (miR-1) es van quantificar mitjançant qPCR en mostres de pàncrees i de cor d'individus NOD femella. Es van analitzar animals normoglucèmics (NG) de 8 setmanes d'edat i animals hiperglucèmics (HG) de 24 setmanes d'edat. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, N= 4-6 animals per grup. U.a.: unitats arbitràries.

Així doncs, l'ús d'un vector AAV8 administrat intraductalment al pàncrees de ratolins NOD de 4 setmanes seria una aproximació apropiada per a dirigir l'expressió d'un transgèn com IGF-1 al pàncrees dels ratolins NOD. A més, la incorporació de les seqüències miRT-122a i miRT-1 en la regió del 3'-UTR del constructe AAV podria ser una estratègia eficient per a bloquejar l'expressió del transgèn en teixits no desitjats, com el fetge i el cor, sense alterar els nivells d'expressió a pàncrees. D'aquesta manera, s'aconseguiria una sobreexpressió local d'IGF-1 al pàncrees dels individus tractats. A més, la inhibició de l'expressió del transgèn proporcionada pel reconeixement de les seqüències diana dels miR-122a i miR-1 a fetge i a cor, respectivament, no es veuria alterada durant l'avenç del procés diabètic en els ratolins NOD.

3. CONSTRUCCIÓ D'UN VECTOR VIRAL ADENOASSOCIAT CODIFICANT PER LA PROTEÏNA IGF-1 MURINA

A partir dels antecedents disponibles en la bibliografia, així com dels resultats obtinguts en els experiments anteriors, es va procedir a la generació d'un constructe per a la producció de vectors AAV8 capaç de dirigir la sobreexpressió d'IGF-1 al pàncrees d'individus NOD femella. Amb l'objectiu d'aconseguir nivells elevats de sobreexpressió del transgèn i de transduir el major nombre possible de cèl·lules del pàncrees, es va utilitzar el promotor ubic CAG. D'aquesta manera, la producció d'un factor soluble com IGF-1 per part d'aquelles cèl·lules β transduïdes, així com per altres tipus cel·lulars del pàncrees, arribaria de forma paracrina a la resta de cèl·lules β no transduïdes. Per tal de bloquejar l'expressió d'IGF-1 a teixits no desitjats com el fetge i el cor, es van incorporar en la regió 3'-UTR del constructe 4 còpies de la seqüència diana del microRNA-122a (miRT-122a), i 4 còpies de la seqüència diana del microRNA-1 (miRT-1) (pAAV-CAG-IGF1-miRT122a-miRT1). Per simplificar la nomenclatura del constructe, es va fer servir el terme dmiRT per fer referència a la presència dels miRTs 122a i 1 (pAAV-CAG-IGF1-dmiRT) (Figura 52).

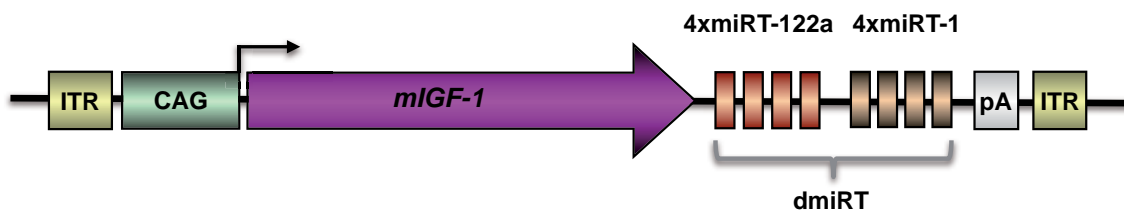


Figura 52. Representació esquemàtica del constructe codificant per la proteïna IGF-1 murina pAAV-CAG-IGF1-dmiRT. ITR: *Inverted Terminal Repeats*; CAG: promotor híbrid basat en el promotor de la β -actina de pollastre i l'*enhancer* del Citomegalovirus; mIGF-1: seqüència murina del gen *Igf-1*; miRT-122a: seqüència diana del microRNA de fetge 122a (4 còpies); miRT-1: seqüència diana per al microRNA de cor 1 (4 còpies); pA: *poly A*, seqüència de poliadenilació. La forma abreviada *dmiRT* fa referència a les seqüències diana pels dos microRNAs 122a i 1.

3.1. Comprovació de l'expressió del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT *in vitro* i *in vivo*.

Abans de produir els vectors virals de serotip 8 AAV8-CAG-IGF1-dmiRT es va comprovar l'expressió *in vitro* del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT generat. Per això, es van transfectar cèl·lules Ins-1 (d'insulinoma de rata) i cèl·lules C2C12 (mioblast de ratolí) i es van quantificar els nivells d'expressió d'*Igf-1*. A més, l'expressió del constructe pAAV-

CAG-IGF1-dmiRT també va ser avaluada *in vivo* mitjançant l'administració hidrodinàmica a ratolins ICR.

3.1.1. Transfecció del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT en cèl·lules INS-1

La línia cel·lular Ins-1 va ser obtinguda a partir d'un insulinoma de rata i constitueix una de les línies més emprades per a l'estudi *in vitro* de la cèl·lula β . Amb l'objectiu d'avaluar si el constructe generat expressava correctament *Igf-1* es van transfectar cèl·lules Ins-1 amb el plasmidi pAAV-CAG-IGF1-dmiRT. A més, per tal de valorar la possible influència de les seqüències diana dels microRNAs 122a i 1 en l'expressió del constructe, es van transfectar també cèl·lules Ins-1 amb un vector que contenia el mateix *cassette* d'expressió però sense les seqüències diana dels microRNAs 122a i 1 (pAAV-CAG-IGF1).

A les 48 hores post-transfecció, es va aïllar el mRNA de les cèl·lules i es van quantificar els nivells d'expressió d'*Igf-1* mitjançant PCR quantitativa. El resultat va mostrar una elevada expressió del transcrit *Igf-1* en les cèl·lules transfectades en comparació a les cèl·lules control sense transfectar, verificant així la funcionalitat del vector d'expressió generat. A més, els nivells de sobreexpressió d'*Igf-1* a partir del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT eren indistingibles dels nivells obtinguts amb el constructe pAAV-CAG-IGF1 (Figura 53). Aquestes dades indicaven que el plasmidi era funcional *in vitro* i que les seqüències diana dels microRNAs 122a i 1 no interferien en l'expressió d'*Igf-1* en les cèl·lules Ins-1.

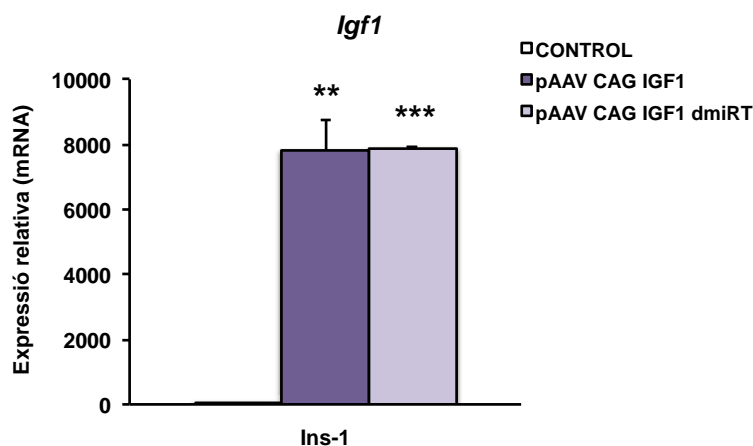


Figura 53. Comprovació de l'expressió *in vitro* del constructe plasmídic pAAV-CAG-IGF1-dmiRT en cèl·lules Ins-1. Quantificació dels nivells d'expressió d'*Igf-1* 48h post-transfecció. Es van utilitzar plaques de 12 pous i cada pou es va transfectar amb 1 μ g de DNA. Els pous control no es van transfectar amb cap DNA. Valors expressats en unitats arbitràries equivalents als resultats de la qPCR normalitzats pel gen *Rplp0*. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM, N= 3 pous per condició. **p<0.01 vs. control; ***p<0.001 vs. control.

3.1.2. Transfecció del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT en cèl·lules C2C12: funcionalitat de la seqüència diana del microRNA-1

Les cèl·lules C2C12, una línia immortalitzada de mioblasts de ratolí, proliferen ràpidament en condicions d'elevada concentració de sèrum, i es diferencien i fusionen en mitotubs en condicions de baixa concentració de sèrum. A més, s'ha descrit que les cèl·lules C2C12 expressen el microRNA-1 i que els nivells d'expressió d'aquest microRNA augmenten a mesura que avança la diferenciació cel·lular assolint la màxima expressió a dia 6 de diferenciació (Kang et al., 2012). Així, amb l'objectiu de comprovar l'expressió d'IGF-1 i de la seqüència diana del microRNA-1 en el constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT, es van transfectar cèl·lules C2C12 i es va induir el procés de diferenciació d'aquestes cèl·lules. Per poder valorar l'efecte de la seqüència diana del microRNA-1 en el constructe, es van transfectar també cèl·lules amb el vector pAAV-CAG-IGF1.

Al cap de 6 dies de la transfecció i d'haver induït la diferenciació a mitotubs, es va aïllar el mRNA de les cèl·lules i es van quantificar els nivells d'expressió d'*Igf-1* mitjançant PCR quantitativa. Els resultats van permetre observar una marcada sobreexpressió d'*Igf-1* en les cèl·lules C2C12 transfectades amb el vector pAAV-CAG-IGF1. No obstant, la presència de la seqüència diana del microRNA-1 en el constructe plasmídic pAAV-CAG-IGF1-dmiRT va provocar una disminució d'aproximadament el 50% en l'expressió d'*Igf-1* en comparació amb els nivells obtinguts a partir del constructe pAAV-CAG-IGF1 (Figura 54).

Aquests resultats validaven l'ús de la seqüència diana del microRNA-1 per a disminuir els nivells d'expressió d'*Igf-1* en cèl·lules musculars.

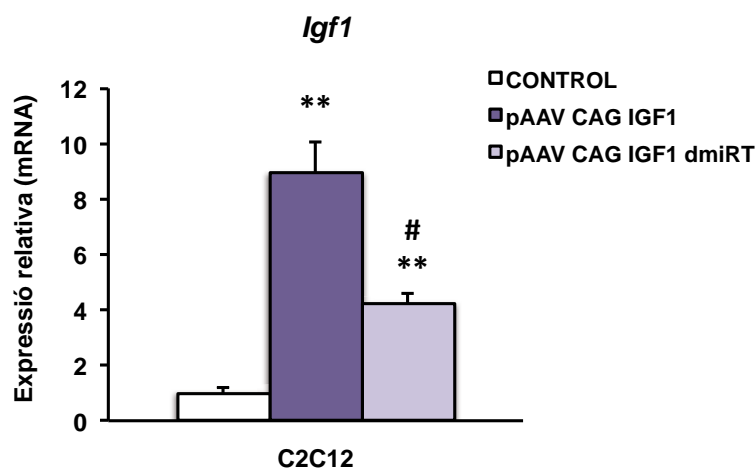


Figura 54. Comprovació de l'expressió *in vitro* del constructe plasmídic pAAV-CAG-IGF1-dmiRT en cèl·lules C2C12. Quantificació dels nivells d'expressió d'*Igf-1* 6 dies post-transfecció i post-inducció del procés de diferenciació de les cèl·lules. Es van utilitzar plaques de 6 pous i cada pou es va transfectar amb 4 µg de DNA 6 hores abans d'iniciar el procés de diferenciació. Els pous control no es van transfectar amb cap DNA. Valors expressats en unitats arbitràries equivalents als resultats de la qPCR normalitzats pel gen *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, N= 3 pous per condició. **p<0.01 vs. control; #p<0.05 vs pAAV CAG IGF1.

3.1.3. Administració hidrodinàmica del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT en ratolins ICR: funcionalitat de la seqüència diana del microRNA-122a a fetge

La línia cel·lular majoritàriament emprada per a l'estudi *in vitro* del teixit hepàtic, les cèl·lules HepG2 derivades d'un carcinoma hepatocel·lular, no expressen el microRNA-122a (Jopling et al., 2005). Per tant, per poder avaluar l'expressió i funcionalitat de la seqüència diana del microRNA-122a, expressat al fetge, i validar l'expressió del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT *in vivo*, es va dur a terme una injecció hidrodinàmica del vector en ratolins ICR. L'administració hidrodinàmica per la vena de la cua (*HTV injection*) de DNA plasmídic és una eina molt valuosa per a la transferència de gens al fetge del ratolí. Consisteix en una injecció ràpida en aproximadament 5 segons d'una solució fisiològica que conté el DNA plasmídic en un volum equivalent al 8-10% del pes corporal del ratolí. Va ser descrita per primera vegada fa més d'una dècada (Liu et al., 1999; Zhang et al., 1999) i des d'aleshores ha esdevingut un mètode molt comú per a la validació *in vivo* de constructes d'expressió així com per altres aplicacions. Així, ratolins ICR de 8 setmanes d'edat van ser administrats per mitjà de la injecció hidrodinàmica per la vena de la cua amb el constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT. Per poder comparar l'efecte de la seqüència diana del microRNA-122a, es van injectar també animals amb el vector pAAV-CAG-IGF1.

A les 24 hores post-administració, es va recuperar el fetge, es va aïllar el mRNA dels hepatòcits i es van quantificar els nivells d'expressió d'*Igf-1* mitjançant PCR quantitativa. Els resultats van mostrar que la presència de la seqüència diana del microRNA-122a en el constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT era capaç de bloquejar completament l'expressió d'*Igf-1* en el fetge dels ratolins. En canvi, en els animals injectats amb el vector pAAV-CAG-IGF1 es va obtenir una marcada sobreexpressió d'*Igf-1* en aquest teixit (Figura 55). Aquests resultats indicaven que el vector d'expressió pAAV-CAG-IGF1-dmiRT era també funcional *in vivo* i validaven l'ús de la seqüència diana del microRNA-122a per a disminuir els nivells d'expressió d'*Igf-1* a les cèl·lules hepàtiques.

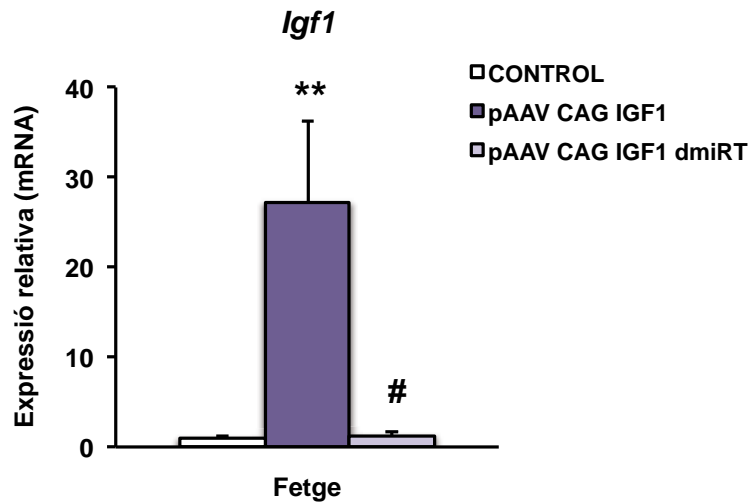


Figura 55. Comprovació de l'expressió *in vivo* del constructe plasmídic pAAV-CAG-IGF1-dmiRT mitjançant administració hidrodinàmica en ratolins ICR. Quantificació dels nivells d'expressió d'*Igf-1* al fetge 24h post-injecció hidrodinàmica de 20 µg de DNA. Valors expressats en unitats arbitràries equivalents als resultats de la qPCR normalitzats pel gen *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n= 3-5 animals mascles per grup. **p<0.01 vs. salina; #p<0.05 vs. pAAV CAG IGF1.

3.2. Producció dels vectors AAV8-CAG-IGF1-dmiRT per a la transferència gènica del pàncrees en els ratolins NOD

Un cop validada l'expressió del constructe pAAV-CAG-IGF1-dmiRT tant *in vivo* com *in vitro*, es va procedir a la producció dels vectors AAV de serotip 8 AAV8-CAG-IGF1-dmiRT. A més, per poder confirmar que les seqüències diana dels microRNAs 122a i 1 contingudes en el AAV8-CAG-IGF1-dmiRT eren també funcionals en el ratolí NOD i no alteraven l'expressió en el pàncrees, es van generar vectors que codificaven pel mateix constructe d'expressió sense el fragment dmiRT (AAV8-CAG-IGF1). Finalment, per tal de descartar qualsevol efecte produït per l'administració d'un vector AAV8, es van generar també vectors que no codificaven per cap transgèn (AAV8-CAG-NUL) (Figura 56).

Tots els vectors virals AAV8-CAG-IGF1-dmiRT, AAV8-CAG-IGF1 i AAV8-CAG-nul es van produir utilitzant el sistema de triple transfecció en cèl·lules HEK-293 tal i com s'especifica en l'apartat de Material i Mètodes. Un cop generats, van ser administrats en ratolins NOD per avaluar la seva infectivitat.

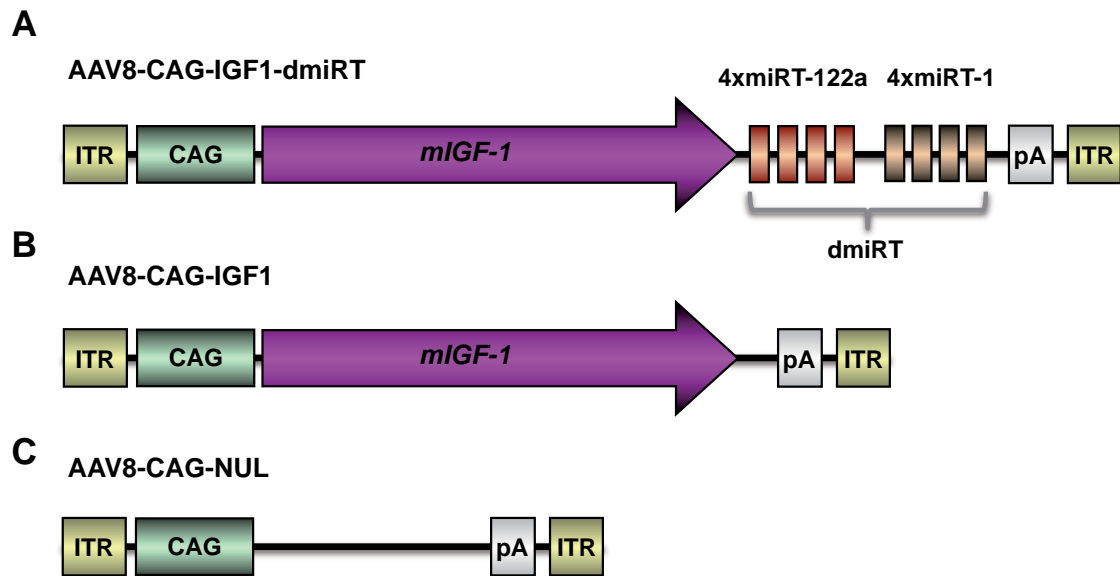


Figura 56. Representació esquemàtica del genoma dels vectors AAV8 generats. (A) AAV8-CAG-IGF1-dmiRT. Genoma del vector AAV8 que expressa *Igf-1* i les seqüències diana per als microRNAs 122a i 1 (dmiRT). **(B) AAV8-CAG-IGF1.** Genoma del vector AAV8 que expressa *Igf-1* sense el fragment dmiRT. **(C) AAV8-CAG-NUL.** Genoma del vector AAV8 no codificant per a cap transgèn. Tots els vectors virals contenen el promotor CAG (promotor híbrid basat en el promotor de la β -actina de pollastre i l'enhancer del Citomegalovirus) i la seqüència de poliadenilació (pA) flanquejades per les ITRs. La representació esquemàtica no és a escala.

3.2.1. Anàlisi de la infectivitat i expressió *in vivo* dels vectors AAV8-CAG-IGF1-dmiRT en ratolins NOD

Ratolins NOD femella de 4 setmanes d'edat van ser administrats intraductalment amb els vectors AAV8-CAG-IGF1-dmiRT, AAV8-CAG-IGF1 i AAV8-CAG-NUL a una dosi de 1.4×10^{12} genomes virals per animal per avaluar la seva infectivitat. Passat 1 mes post-administració, es van sacrificar els animals i es van extreure mostres de pàncrees, fetge i cor per quantificar l'expressió d'*Igf-1* i la presència de genomes virals en aquests teixits (Figura 57).

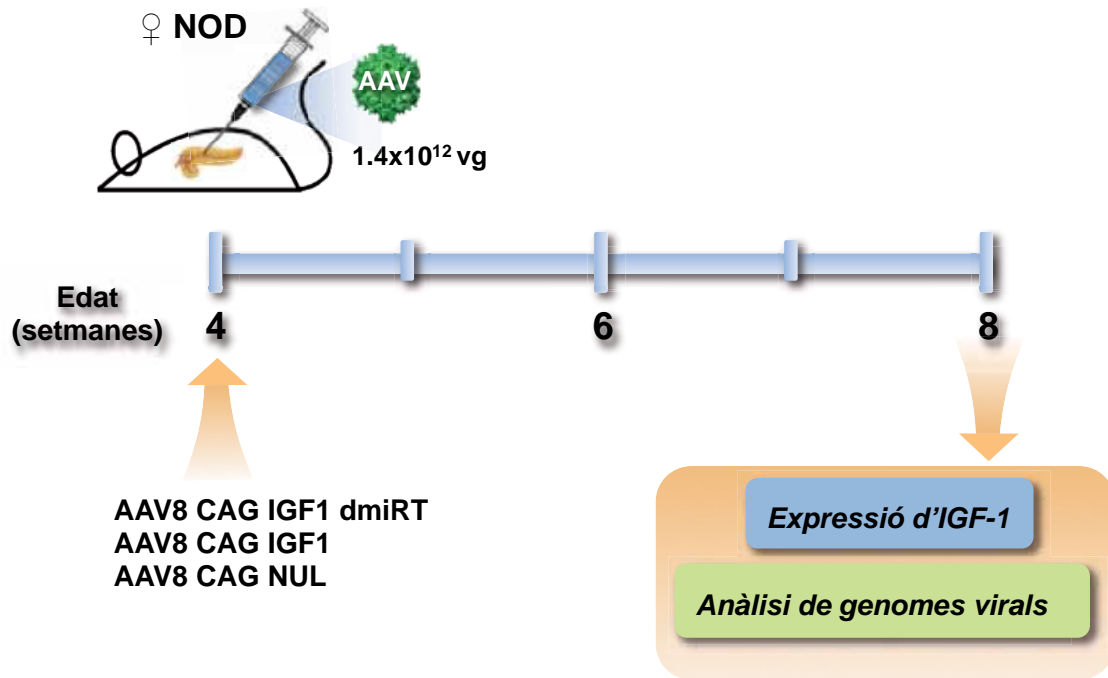


Figura 57. Disseny experimental. Administració intraductal dels vectors virals AAV8-CAG-IGF1-dmiRT, AAV8-CAG-IGF1 i AAV8-CAG-NUL en ratolins NOD femella de 4 setmanes d'edat a una dosi de 1.4×10^{12} genomes virals. Els animals es van sacrificar 1 mes post-injecció i es va analitzar l'expressió d'*Igf-1* i la presència de genomes virals.

L'anàlisi mitjançant PCR quantitativa de l'expressió d'*Igf-1* a pàncrees va mostrar un increment significatiu del mRNA d'*Igf-1* tant en els animals administrats amb els vectors AAV8-CAG-IGF1 com en els animals amb el vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT, en comparació amb el grup control injectat amb el vector AAV8-CAG-NUL. A més, els nivells de sobreexpressió a pàncrees van ser similars entre els dos grups, fet que corroborava la no interferència de les miRT-122a i miRT-1 en l'expressió del transgèn. En canvi, quan es va mesurar l'expressió d'*Igf-1* en el fetge i en el cor, només es van detectar nivells incrementats del mRNA d'*Igf-1* en els animals injectats amb els vectors AAV8-CAG-IGF1. Els animals que van ser administrats amb el vector que contenia les seqüències diana dels microRNAs 122a i 1 (AAV8-CAG-IGF1-dmiRT) van presentar uns nivells d'expressió d'*Igf-1* similars als obtinguts en els animals injectats amb el vector AAV8-CAG-NUL (Figura 58).

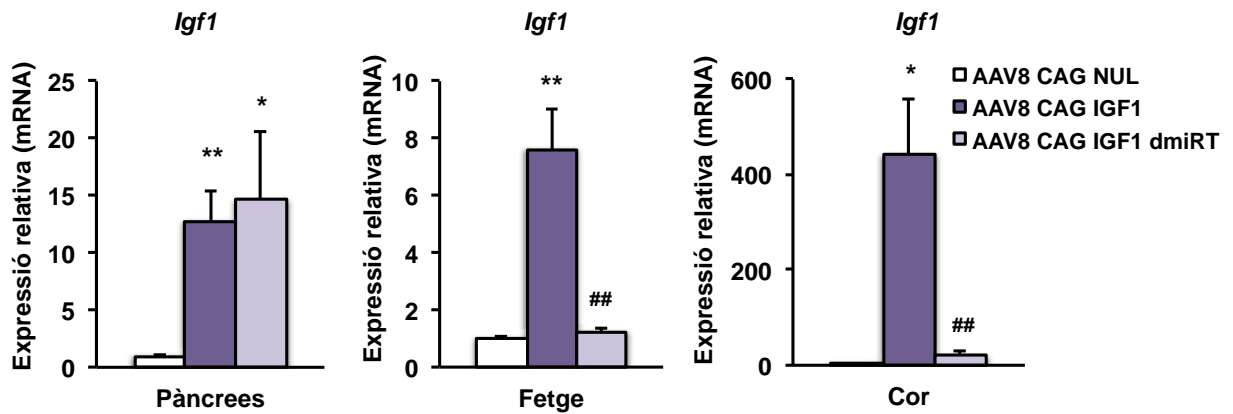


Figura 58. Comprovació de la infectivitat *in vivo* dels vectors virals AAV8-CAG-IGF1-dmiRT mitjançant administració intraductal en ratolins NOD. Quantificació dels nivells d'expressió d'*Igf-1* al pàncrees, fetge i cor d'animals NOD 1 mes post-injecció intraductal de 1.4×10^{12} genomes virals per ratolí. Valors expressats en unitats arbitràries equivalents als resultats de la qPCR normalitzats pel gen *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, n= 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$ vs. AAV8 CAG NUL; ** $p < 0.01$ vs. AAV8 CAG NUL; ## $p < 0.01$ vs. AAV8 CAG IGF1.

Per tal de confirmar que la caiguda d'expressió d'*Igf-1* en el fetge i en el cor dels animals injectats amb el vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT no era deguda a una diferent infectivitat de les preparacions virals AAV8-CAG-IGF1 i AAV8-CAG-IGF1-dmiRT, es va realitzar una quantificació dels genomes virals en aquestes teixits. La presència de genomes virals es va determinar mitjançant PCR quantitativa, tal com s'especifica a l'apartat de Materials i Mètodes. El resultat va permetre observar uns nivells similars de genomes virals presents en el fetge i en el cor dels animals injectats, independentment de la preparació viral. Això indicava que les preparacions virals AAV8-CAG-IGF1-dmiRT, AAV8-CAG-IGF1 i AAV8-CAG-NUL, administrades a la mateixa dosi, presentaven un potencial infectiu similar en el fetge i en el cor dels animals injectats intraductalment. Per tant, confirmava que la menor expressió d'*Igf-1* observada en aquests teixits era deguda a la presència de la seqüència diana del microRNA-122a, al fetge, i del microRNA-1, al cor, en el vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT. A més, es va poder observar que el tropisme dels vectors AAV8, era molt superior al fetge, en comparació amb el cor, on es va detectar una quantitat molt inferior de genomes virals per cèl·lula, fet que ja havia estat descrit anteriorment (Cheng et al., 2007; Jimenez et al., 2011) (Figura 59).

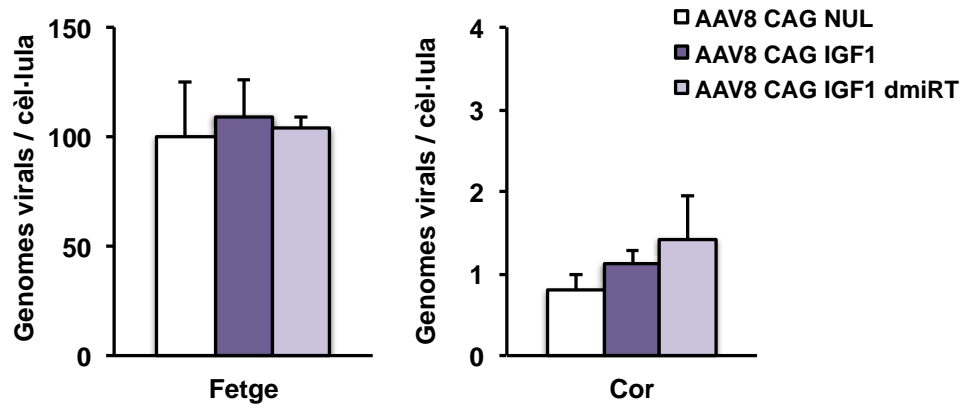


Figura 59. Quantificació de genomes virals a fetge i cor. Els genomes virals corresponents als vectors AAV8-CAG-NUL, AAV8-CAG-IGF1 i AAV8-CAG-IGF1-dmiRT es van quantificar mitjançant qPCR en mostres de fetge i de cor dels animals NOD 1 mes post-injecció intraductal de 1.4×10^{12} genomes virals per ratolí. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, N= 4-5 animals per grup.

Aquests resultats confirmaven que la presència de la seqüència de reconeixement del miR-122a, al fetge, i del miR-1, al cor, en el constructe AAV8-CAG-IGF1-dmiRT, bloquejava l'expressió d'*igf-1* induïda pel vector AAV8 en els teixits esmentats. Així, el vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT administrat intraductalment representava una estratègia adequada per a dirigir la sobreexpressió d'*Igf-1* localment en el pàncrees dels ratolins NOD.

4. ESTUDI DE PREVENCIÓ DE DIABETIS EN RATOLINS NOD ADMINISTRATS AMB EL VECTOR AAV8-CAG-IGF1-dmiRT

Un cop validada la infectivitat i l'expressió del vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT generat, es va estudiar si la seva administració en ratolins NOD era capaç de prevenir el desenvolupament de diabetis. Per això, ratolins femella NOD de 4 setmanes d'edat van ser administrats intraductalment amb una dosi de 1.4×10^{12} genomes virals de AAV8-CAG-IGF1-dmiRT. Com a animals control de la injecció es van utilitzar ratolins femella NOD administrats també per via intraductal i a la mateixa dosi amb el vector viral AAV8-CAG-NUL. Es va triar aquesta edat perquè a les 4 setmanes els animals es troben en l'estadi pre-diabètic i encara no s'ha iniciat la destrucció autoimmunitària de la massa de cèl·lula β . Per tant, seria un estadi apropiat per avaluar si la sobreexpressió pancreàtica d'IGF-1 mediada pel vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT és capaç de protegir el pàncrees endocrí i prevenir la pèrdua de massa de cèl·lula β i la consegüent aparició de diabetis en els ratolins NOD. Un cop administrat el vector, es va confirmar la sobreexpressió d'IGF-1 al pàncrees i es va fer el seguiment de les glucèmies al llarg del temps per tal de determinar la incidència de diabetis en els animals tractats (Figura 60).

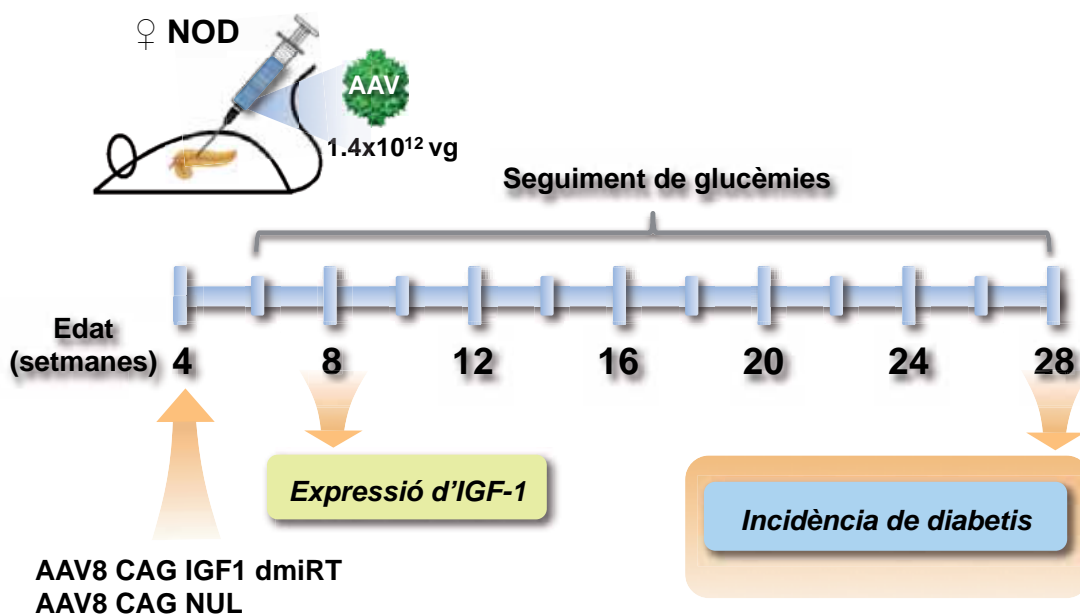


Figura 60. Disseny experimental. Administració per via intraductal dels vectors virals AAV8-CAG-IGF1-dmiRT i AAV8-CAG-NUL en ratolins NOD femella de 4 setmanes d'edat a una dosi de 1.4×10^{12} genomes virals. Un cop administrats els vectors virals es va fer un seguiment de les glucèmies dels animals fins a les 28 setmanes d'edat per tal de determinar la incidència de diabetis.

4.1. Expressió d'IGF-1 en el pàncrees dels animals administrats amb AAV8-CAG-IGF1-dmiRT

Transcorregut 1 mes de l'administració intraductal dels vectors AAV8-CAG-IGF1-dmiRT es va comprovar la sobreexpressió d'IGF-1 al pàncrees dels ratolins NOD. Es va poder observar que els illots dels animals administrats amb el vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT mostraven una clara sobreexpressió d'IGF-1, en comparació amb els illots dels animals administrats amb el vector AAV8-CAG-NUL. La tinció immunohistoquímica del pàncrees contra IGF-1 no va permetre observar la transducció de les cèl·lules acinars possiblement degut a la ràpida secreció del factor soluble IGF-1. D'altra banda, no es va detectar expressió d'IGF-1 al fetge o al cor dels animals administrats amb el vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT (Figura 61).

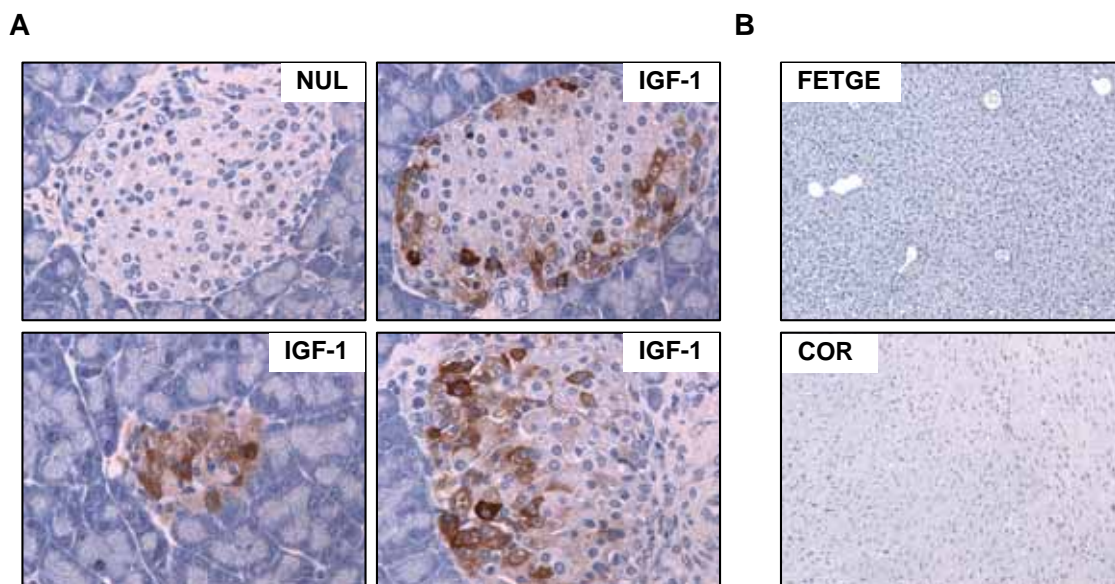


Figura 61. Transducció del pàncrees en les femelles NOD administrades intraductalment amb el vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT. (A,B) Immunohistoquímica dels teixits pàncrees, fetge i cor contra IGF-1 en mostres d'animals NOD injectats intraductalment a les 4 setmanes d'edat amb 1.4×10^{12} genomes virals i sacrificats 1 mes després. **(A)** Transducció dels illots pancreàtics. NUL: AAV8-CAG-NUL; IGF-1: AAV8-CAG-IGF1-dmiRT. Fotografies a 400x. **(B)** Imatge representativa del fetge i del cor dels animals administrats amb els vectors AAV8-CAG-IGF1-dmiRT. Fotografies a 100x.

4.2. Seguiment de la glucèmia en els animals injectats amb AAV8-CAG-IGF1-dmiRT

Per tal d'avaluar com evolucionava el procés d'aparició espontània de diabetis en els animals NOD injectats, es va realitzar un seguiment de la glucèmia fins a les 28 setmanes d'edat de l'animal. L'anàlisi dels perfils glucèmics individuals dels animals injectats va mostrar que la major part dels animals del grup AAV8-CAG-NUL esdevenia diabètic amb l'edat (Figura 62A), mentre que la majoria dels animals tractats amb AAV8-CAG-IGF1-

dmIRT es mantenia normoglicèmic (Figura 62B). A més, els primers animals en mostrar valors d'hiperglicèmia en el grup AAV8-CAG-NUL apareixien a les 14 setmanes d'edat coincidint amb l'inici de diabetis observat en la colònia NOD. En canvi, en el grup tractat amb el vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT els pocs casos d'hiperglicèmia observats apareixien en edats més tardanes, a partir de les 20 setmanes d'edat (exceptuant un animal que va esdevenir hiperglicèmic a les 12 setmanes). En aquests moments s'està continuant el seguiment d'aquests animals al nostre laboratori.

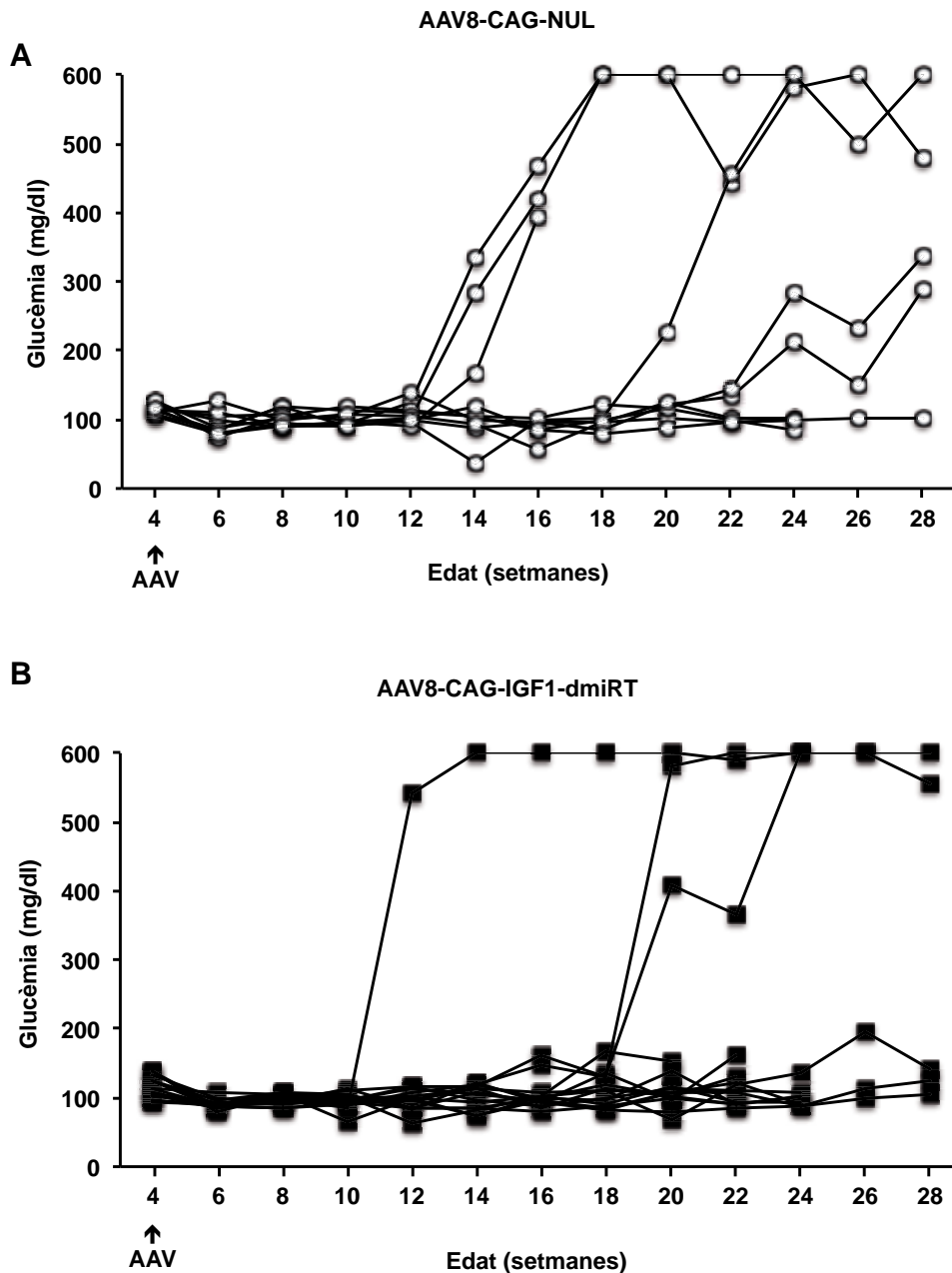


Figura 62. Perfils individuals de glucèmia en els ratolins femella NOD administrats intraductalment amb els vectors AAV8. **(A)** Valors de glucèmia en els animals NOD tractats amb AAV8-CAG-NUL. N=10 **(B)** Valors de glucèmia en els animals NOD tractats amb AAV8-CAG-IGF1-dmiRT. N=16. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM.

4.3. Anàlisi de la incidència de diabetis

A partir del seguiment de la glucèmia en els animals tractats amb el vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT i AAV8-CAG-NUL es va determinar la incidència de diabetis en aquests grups. Es va observar una reducció significativa de la incidència de diabetis autoimmune en els animals NOD tractats amb AAV8-CAG-IGF1-dmiRT. Mentre el grup tractat amb el vector AAV8-CAG-NUL va presentar una incidència de diabetis del 60% a les 28 setmanes d'edat, en els animals tractats amb AAV8-CAG-IGF1-dmiRT la incidència va ser del 19% (Figura 63).

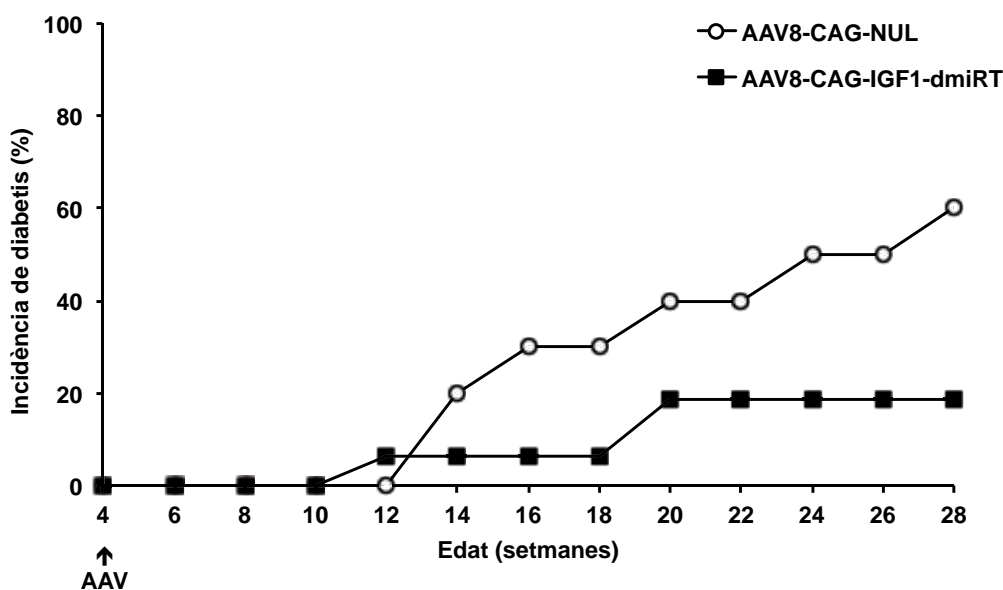


Figura 63. Incidència de diabetis en els ratolins femella NOD administrats intraductalment amb els vectors AAV8. Es va establir que un individu era diabètic quan la seva glucèmia superava els 250 mg/dl en dues mesures consecutives. N= 10 (AAV8-CAG-NUL); N=16 (AAV8-CAG-IGF1-dmiRT).

Aquests resultats suggereixen que la transducció del pàncrees amb els vectors AAV8-CAG-IGF1-dmiRT podria protegir els ratolins NOD del desenvolupament autoimmune de diabetis. Així doncs, aquesta estratègia podria representar una nova aproximació de teràpia gènica per la diabetis tipus 1.

V. DISCUSSIÓ

PART I: ESTUDI DEL PAPER D'IGF-1 EN LA PRESERVACIÓ DE LA MASSA DE CÈL·LULA β EN EL MODEL NOD

La diabetis tipus 1 resulta de la destrucció autoimmune de les cèl·lules β pancreàtiques, el que condueix a la deficiència d'insulina i a la hiperglucèmia (Eizirik et al., 2009). L'inici espontani de la T1D en humans és precedit per una infiltració leucocítica progressiva en els illots (insulitis), que persisteix durant un període de temps relativament llarg abans de la destrucció massiva de les cèl·lules β (Atkinson and Eisenbarth, 2001). Els pacients de T1D són diagnosticats després de perdre pràcticament tota la massa de cèl·lula β (Couper et al., 1991), i requereixen un tractament substitutiu amb insulina per sobreviure. Per tant, les intervencions enfocades a aturar l'atac immunològic en els illots i promoure la supervivència de la cèl·lula β són de gran interès pel tractament de la diabetis.

Varis factors de creixement han mostrat propietats protectores contra la T1D en diferents models animals. Entre ells, l'IGF-1 destaca per ser un potent agent antipaoptòtic i pels seus efectes preventius sobre l'atac autoimmune de la cèl·lula β . En el nostre laboratori s'ha descrit que la sobreexpressió local d'IGF-1 a la cèl·lula β és capaç de prevenir la infiltració de l'illot i la mort de les cèl·lules β en el ratolí transgènic RIP-1/IFN β , un model d'infiltració limfocitària dels illots amb susceptibilitat incrementada al desenvolupament de diabetis (Casellas et al., 2006). A més, l'expressió transgènica d'IGF-1 a les cèl·lules β de ratolins diabètics induïts pel tractament amb múltiples dosis d'STZ (5x50mg/kg), és capaç de regenerar el pàncrees endocrí (Agudo et al., 2008; George et al., 2002).

No obstant, els estudis més rellevants sobre la etiologia de la T1D i el paper de factors importants en la fisiopatologia de l'illot, s'han desenvolupat en bona part en el ratolí NOD. Tot i que existeixen diferències entre el model murí i la malaltia humana, la T1D que desenvolupen els ratolins NOD presenta moltes característiques en comú amb la diabetis autoimmune en humans (Boitard et al., 1993; Jayasimhan et al., 2014; Notkins and Lernmark, 2001). El model NOD, a més, presenta l'avantatge de reproduir el procés inflamatori que té lloc en els illots dels pacients diabètics, en contraposició amb els models induïts amb l'administració de STZ, que causa la mort de la cèl·lula β per un efecte citotòxic directe. Per tot això, aquest treball s'ha centrat en estudiar si la sobreexpressió local d'IGF-1 a les cèl·lules β del pàncrees era capaç de contrarestar la diabetis autoimmune que té lloc de manera espontània en el ratolí NOD. Amb aquesta finalitat es

van generar els animals transgènics NOD-IGF1. Els ratolins NOD-IGF1 mostraven una reducció significativa de la incidència de diabetis espontània. A les 30 setmanes d'edat, només un 3% dels ratolins transgènics esdevenien diabètics en comparació amb un 70% dels animals NOD. Els animals NOD-IGF1 es mantenien normoglicèmics i conservaven la massa de cèl·lula β i la tolerància a la glucosa amb l'edat, a diferència de l'evolució diabètica que experimentaven els ratolins NOD.

L'estudi morfològic del pàncrees va permetre observar que els ratolins NOD-IGF1 no presentaven canvis en el pes del pàncrees ni en la distribució de les cèl·lules endocrines dins l'illot a diferència de les alteracions que causa la sobreexpressió d'altres factors de creixement homòlegs com IGF-2 (Devedjian et al., 2000). A més, tampoc no es van identificar variacions en el percentatge dels illots quan van ser classificats per categories de mida. No obstant, la massa de cèl·lula β total era 2.5 vegades superior en els pàncrees dels ratolins NOD-IGF1 comparats amb els ratolins NOD degut a un increment del nombre total d'illots. La cascada de senyalització d'IGF-1, coordinada principalment pel substrat IRS-2, té un paper essencial en la regulació del creixement, funció i supervivència de la cèl·lula β (Rhodes and White, 2002). A més, s'ha descrit que ratolins transgènics que expressen IRS-2 en la cèl·lula β presenten el doble de massa de cèl·lula β comparat amb els seus germans control (Hennige et al., 2003). Així, la via IGF1-IRS2 podria ser responsable de l'augment d'illots en els ratolins NOD-IGF1. De la mateixa manera, animals NOD transgènics per IRS-2 específicament a les cèl·lules β presenten un efecte similar en la densitat d'illots i la massa de cèl·lula β (Norquay et al., 2009).

El manteniment de la massa de cèl·lula β adulta està regulat principalment per l'equilibri entre la replicació de les cèl·lules β pre-existents i la mort per apoptosi de la cèl·lula β (Bouwens and Rooman, 2005). Quan es va estudiar la taxa replicació de les cèl·lules β en els animals NOD i NOD-IGF1 pre-diabètics no es van detectar canvis entre els dos grups en el percentatge de cèl·lules β Ki67 positives. Tampoc no es van observar alteracions en els nivells d'expressió gènica d'elements del cycle cel·lular que regulen la replicació de la cèl·lula β com Cdk4, i les ciclines D1 i D2 (Kushner et al., 2005; Rane et al., 1999). En canvi, en l'anàlisi dels inhibidors del cycle cel·lular es va observar un augment significatiu de l'expressió gènica de p21. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en treballs anteriors, on s'havia descrit que la sobreexpressió d'IGF-1 a la cèl·lula β no era capaç d'induir l'increment de replicació de les cèl·lules β en ratolins sans (Agudo et al., 2008). En aquest cas, també es va observar un increment de l'inhibidor p21 que podria

estar frenant la progressió del cicle cel·lular com a mecanisme compensatori als efectes proliferatius d'IGF-1. De la mateixa manera, la sobreexpressió de IRS-2 a les cèl·lules β d'animals transgènics NOD no indueix un augment de la replicació en els illots pre-diabètics no infiltrats (Norquay et al., 2009).

L'altre mecanisme important implicat en la regulació de la massa de cèl·lula β és la mort cel·lular per apoptosi. La determinació de la taxa d'apoptosi va mostrar una reducció del nombre de cèl·lules β TUNEL positives en els illots dels animals NOD-IGF1. L'IGF-1 és un potent factor antiapoptòtic (Kooijman, 2006), així que l'augment local d'aquest factor als illots pancreàtics NOD-IGF1 podria actuar com un factor de supervivència capaç de prevenir la mort de la cèl·lula β . D'acord amb la sobreexpressió d'IGF-1 a les cèl·lules β , es va observar un augment de la senyalització d'IGF-1 a través de nivells incrementats de P-AKT en els illots. És probable que l'activació de la via de senyalització de la P-AKT fos la responsable dels efectes anti-apoptòtics d'IGF-1 en els illots dels animals NOD-IGF1. Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts en altres models on l'absència del IGF-1R en la cèl·lula β , causa deficiència de P-AKT, mort accelerada de les cèl·lules β i diabetis (Ueki et al., 2006). Així doncs, l'activació de la cascada de senyalització d'IGF-1 produiria un efecte anti-apoptòtic en la cèl·lula β que podria explicar el manteniment de la massa de cèl·lula β en els ratolins NOD-IGF1 amb el temps.

Una de les característiques principals de la T1D és la pèrdua de tolerància als antígens de la cèl·lula β que resulta en una destrucció autoimmune de les cèl·lules β . Aquest procés té lloc per mitjà de la infiltració de cèl·lules del sistema immune en els illots i avança progressivament amb l'edat, essent responsable de la pèrdua de massa de cèl·lula β . Quan es va mesurar la insulitis en els ratolins NOD i NOD-IGF1 es va observar una clara reducció del nombre d'illots que presentaven infiltració limfocítica en els animals NOD-IGF1 a les 15 setmanes d'edat. Aquesta reducció de la insulitis es mantenia en els animals NOD-IGF1 en edats més avançades mentre que empitjorava significativament en els ratolins NOD a mida que envellien i avançaven en el procés diabètic. Així doncs, la sobreexpressió pancreàtica d'IGF-1, a més de produir un efecte anti-apoptòtic en la cèl·lula β , també era capaç de prevenir el desenvolupament d'insulitis en els ratolins NOD-IGF1. Aquest fet posa de manifest les funcions immunomodulatòries d'IGF-1 ja que la sobreexpressió d'altres elements de la mateixa cascada de senyalització, com IRS-2, no protegeixen de la infiltració limfocítica dels illots en el ratolí NOD (Norquay et al., 2009). Altres estudis corroboren la capacitat d'IGF-1 d'exercir efectes immunomodulatoris en el model NOD i en altres models de diabetis autoimmune. L'administració diària subcutània de proteïna IGF-1 humana

recombinant a ratolins NOD prediabètics redueix la severitat de la insulinitis i la incidència de diabetis tipus 1 (Bergerot et al., 1995; Chen et al., 2004; Kaino et al., 1996). D'altra banda, la sobreexpressió d'IGF-1 en els illots de ratolins transgènics per IFN β contrarresta la infiltració dels illots (Casellas et al., 2006). A més d'una reducció de la insulinitis, en els illots dels animals transgènics NOD-IGF1 hi havia una menor expressió de citokines inflamatòries implicades en la destrucció autoimmune de la cèl·lula β (MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , IL-1 β , MCP-1, IFN- γ , etc.). Aquests resultats milloren els obtinguts en animals NOD tractats amb proteïna IGF-1 recombinant, on no es van detectar canvis importants en els nivells de IFN- γ , MIP-1 α o MIP-1 β en el pàncrees (Chen et al., 2004). En diversos estudis, s'ha comprovat que IGF-1 proporciona una protecció contra l'apoptosi en illots cultivats amb citokines pro-inflamatòries com IL-1 β , TNF- α , o IFN- γ , i contra la inhibició de la secreció d'insulina induïda per aquestes citokines (Giannoukakis et al., 2000; Harrison et al., 1998; Mabley et al., 1997). El mateix s'observa quan es cultiven illots d'animals NOD pre-diabètics amb IGF-1 i en presència de citokines inflamatòries (Hill et al., 1999). Així doncs, els illots dels animals transgènics NOD-IGF1 estarien protegits contra els mecanismes de mort de l'infiltrat limfocític dels illots i això, al seu torn, reduiria el reclutament de més cèl·lules del sistema immune i, en conseqüència, increment de l'expressió de citokines pro-inflamatòries.

Aquesta marcada reducció de la presència i progressió de la insulinitis, així com dels seus mediadors químics, explicaria perquè en els illots dels animals transgènics que sobreexpressen IGF-1 no es produïa una pèrdua progressiva de la massa de cèl·lula β , pèrdua de la tolerància a la glucosa i finalment, aparició d'hiperglucèmia i hipoinsulinèmia (diabetis oberta). No obstant, es desconeixien els mecanismes mitjançant els quals IGF-1 era capaç de frenar la resposta immune contra els illots.

Estudis en models animals transgènics (Allison et al., 1988; Lo et al., 1988; Sarvetnick et al., 1988) i en limitades dades obtingudes d'estudis post-mortem en humans (Foulis and Farquharson, 1986; Foulis et al., 1987) indiquen un paper important de les molècules del MHC en l'inici de la destrucció de la cèl·lula β i el desenvolupament de diabetis. S'ha descrit que hi ha una sobreexpressió de molècules del MHC-I i una expressió aberrant de molècules del MHC-II en cèl·lules de l'illot en estadis previs a la presència de l'infiltrat inflamatori (Foulis, 1987; Foulis et al., 1987). La destrucció de les cèl·lules β en la T1D és un procés complex mediat per cèl·lules T del sistema immune i requereix la participació tant de cèl·lules T CD8⁺, restringides a la presentació per molècules MHC-I; com de cèl·lules T CD4⁺, restringides a la presentació per molècules MHC-II (Wicker et al., 1995).

Així doncs, la presentació d'antígens per part d'ambdues molècules MHC-I i MHC-II té un paper molt important en la T1D. Per aquest motiu, i per valorar si les molècules del MHC estaven involucrades en la prevenció de diabetis observada en el ratolí NOD-IGF1, es van mesurar els nivells d'expressió relativa del gens que codifiquen per les molècules del MHC-I (β -2-microglobulina) i del MHC-II (H2-Aa) en els illots dels animals que sobreexpressaven IGF-1. Es va observar una disminució de l'expressió d'aquests marcadors en comparació amb els animals NOD. La presentació en la cèl·lula β d'autoantígens o bé d'antígens relacionats amb desencadenants ambientals (per exemple infecció vírica) a través del MHC-I fa que la cèl·lula sigui reconeguda i selectivament destruïda per cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques. La importància d'aquesta molècula és clau per al desenvolupament d'insulitis en el ratolí NOD i pot determinar per si sola l'activació de cèl·lules T diabetogèniques (Hamilton-Williams et al., 2001). En conseqüència, la menor expressió de MHC-I a les cèl·lules β dels animals transgènics que sobreexpressen IGF-1, les faria menys visibles pel sistema immune i, per tant, podrien escapar de la destrucció autoimmune. Altres treballs han relacionat el paper d'IGF-1 en l'evasió del sistema immune mitjançant estudis en diferents línies cel·lulars, on la inhibició de l'expressió d'IGF-1 té lloc de manera coordinada amb l'augment de MHC-I a la superfície de les cèl·lules tractades (Ly et al., 2000; Upegui-Gonzalez et al., 1998). D'altra banda, quan IGF-1 és co-expressat a la cèl·lula β d'animals transgènics RIP-1/IFN- β , model que sobreexpressa MHC-I (Pelegrin et al., 1998), també s'observa una marcada reducció dels nivells d'expressió de β 2-microglobulina, en paral·lel amb una reducció de la infiltració limfocítica dels illots (Casellas et al., 2006).

A part del paper dels MHC, altres estudis han posat de manifest la importància de les molècules co-estimuladores B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86) en el desenvolupament de diabetis en els ratolins NOD (Lenschow et al., 1995). La interacció CD28/B7 constitueix una important senyal de co-estimulació, responsable de l'activació òptima de la cèl·lula T mediada pel reconeixement d'antigen, i la proliferació i supervivència de les cèl·lules T activades. Tant és així, que l'expressió ectòpica de les molècules del MHC-I o II en els illots de Langerhans és insuficient per activar cèl·lules T potencialment autoreactives (Burkly et al., 1990; Slattery et al., 1993). No obstant, la coexpressió de molècules coestimuladores apropiades, com B7.1, en els illots activa aquestes cèl·lules i resulta en una destrucció autoimmune dels illots (Guerder et al., 1994; Harlan et al., 1994; Heath et al., 1992). La quantificació mitjançant qPCR de les molècules co-estimulatòries B7.1 i B7.2 va revelar una disminució dels nivells d'expressió relativa d'aquestes molècules en les mostres d'illots dels animals NOD-IGF1. Així doncs, a més de reduir l'expressió de MHC-I a les

cèl·lules β , IGF-1 podria disminuir també l'expressió de les molècules coestimuladores B7.1 o B7.2. En relació amb això, s'ha descrit que quan es bloqueja l'expressió o senyalització d'IGF-1 en cèl·lules de glioma s'observa un augment de l'expressió de la maquinària de presentació d'antigen del MHC-I, incloent les molècules de coestimulació B7 (Pan et al., 2013; Trojan et al., 1996). La disminució tant del MHC-I com de les molècules coestimuladores B7 portaria a una menor presentació d'antígens, i a una estimulació deficient de la resposta immune que podria explicar perquè els illots dels animals NOD-IGF1 escapen de la massiva infiltració observada en els animals NOD. Alhora, un menor reclutament de cèl·lules especialitzades del sistema immune en els animals NOD-IGF1 justificaria la disminució de l'expressió de molècules MHC-II en els illots.

D'altra banda, la supressió de les respostes autoreactives de les cèl·lules T contra l'illot pancreàtic és un pre-requisit indispensable per assolir una correcció a llarg termini de la malaltia com la que s'observa en els animals NOD-IGF1. En aquest sentit, les cèl·lules Treg juguen un paper fonamental i són crucials pel manteniment de l'homeòstasi i la tolerància del sistema immune en els illots pancreàtics (Feurerer et al., 2009; Geiger and Tauro, 2012; Sakaguchi et al., 2010). La quantificació de les cèl·lules Treg presents al pàncrees i als PLNs dels animals NOD-IGF1 va mostrar un augment en el percentatge d'aquestes cèl·lules en comparació amb els animals NOD, tot i que les diferències no van assolir significació estadística. Aquests canvis, no es van observar en el percentatge de Tregs en la melsa, indicant que no es tractava d'un efecte generalitzat sinó que tenia lloc de manera local en el pàncrees dels individus. Així doncs, l'augment local d'IGF-1 en els illots dels animals transgènics podria estar reclutant o estimulant la formació de Tregs al pàncrees i als PLN dels ratolins NOD-IGF1 i d'aquesta manera, frenant l'atac autoimmune dels illots.

D'acord amb això, en un treball realitzat al nostre laboratori, es va demostrar que l'expressió d'IGF-1 a les cèl·lules no parenquimals del fetge, provocava un augment de cèl·lules Treg intrahepàtiques i intrapancreàtiques, que eren responsables de la menor incidència de diabetis en un model murí autoimmune de la malaltia (Anguela et al., 2013). De manera similar, la transferència de cèl·lules T autoreactives a ratolins NOD tractats amb IGF-1 redueix la incidència de diabetis degut a una reducció de la insulinitis i canvis en l'activació de cèl·lules T del sistema immune (Bergerot et al., 1996). Aquests resultats suggereixen un possible mecanisme d'acció de l'IGF-1 sobre les cèl·lules T activades, que també expressen receptors per l'IGF-1 (Kooijman et al., 1992; Stuart et al., 1991; Tapson et al., 1988), a més dels coneguts efectes directes d'aquest factor en la supervivència dels

illots. A més a més, els efectes d'IGF-1 sobre la modulació del sistema immune també han estat descrits recentment en desordres inflamatoris no autoimmunes. L'expressió ectòpica d'IGF-1 en la pell del ratolí suprimeix la dermatitis al·lèrgica per contacte de manera específica de les cèl·lules Treg, augmentant el nombre d'aquestes cèl·lules en l'àrea afectada (Johannesson et al., 2014). En aquest estudi, els efectes beneficiosos d'IGF-1 es perdien en ratolins amb una deleció de l'IGF-1R específicament a les Treg, indicant les accions directes d'IGF-1 en l'estimulació de les cèl·lules Treg (Johannesson et al., 2014).

En conjunt, aquestes dades indicarien que la sobreexpressió d'IGF-1 a les cèl·lules β dels illots NOD-IGF1 els confereix una resistència a l'apoptosi, alhora que indueix una menor expressió de molècules presentadores d'antigen i estimuladores de la resposta immune que redueixen la insulinitis i, en conseqüència, l'expressió de citoquines inflamatòries en els illots. Això, a més, podria tenir lloc de manera coordinada a un increment en la proporció de cèl·lules Treg al pàncrees estimulat per la sobreexpressió d'IGF-1, que contribuiria al manteniment de la tolerància immune en els illots. D'aquesta manera, IGF-1 seria capaç tant de frenar el procés de la destrucció autoimmune de les cèl·lules β com de mantenir els animals NOD-IGF1 lliures del desenvolupament de diabetis. Per tot això, la transferència gènica d'IGF-1 al pàncrees podria representar una nova aproximació de teràpia gènica per la diabetis tipus 1.

PART II: APROXIMACIÓ DE TERÀPIA GÈNICA DIRIGIDA AL PÀNCREES BASADA EN LA TRANSFERÈNCIA D'IGF-1 PER CONTRARRESTAR LA DIABETIS AUTOIMMUNE EN EL RATOLÍ NOD

Els tractaments disponibles actuals per la T1D es basen en teràpies de reemplaçament d'insulina que són requerides durant tota la vida del pacient per reduir els nivells de glucosa en sang. No obstant, aquests tractaments no prevenen el desenvolupament de complicacions secundàries a llarg termini derivades de la hiperglucèmia crònica, que són la principal causa de mort dels pacients de T1D. D'altra banda, el transplantament de pàncrees o d'illots ofereix també una possibilitat terapèutica per a la T1D ja que proporcionen una font endògena d'insulina fisiològicament regulada. No obstant, l'escassetat de donants, el rebuig immunològic i la necessitat de la immunosupressió fa que aquestes alternatives siguin limitades (Jahansouz et al., 2011). Per tal de superar aquests inconvenients, cal desenvolupar noves aproximacions preventives o curatives per la T1D. En aquest sentit, la teràpia gènica ofereix una nova eina de tractament amb grans possibilitats.

D'acord amb els resultats obtinguts en la Part I d'aquest treball, així com en d'altres estudis del nostre grup (Agudo et al., 2008; Casellas et al., 2006; George et al., 2002), l'expressió local d'IGF-1 podria ser una aproximació segura per a protegir o regenerar el pàncrees endocrí. Així IGF-1 seria un possible gen terapèutic candidat al desenvolupament d'estratègies de teràpia gènica per a contrarestar la diabetis.

Recentment, el nostre grup ha demostrat que els vectors de teràpia gènica AAV poden ser utilitzats per a dirigir una expressió eficient i a llarg termini de transgens en el pàncrees (Jimenez et al., 2011). En concret, els vectors AAV8 permeten una elevada transducció del pàncrees endocrí i exocrí quan són administrats per via intraductal (Jimenez et al., 2011). Per tot això, en la Part II d'aquest treball es va desenvolupar una estratègia de teràpia gènica amb vectors AAV8 administrats intraductalment al pàncrees del ratolí NOD per tal de transferir el gen *Igf-1* i avaluar la prevenció de diabetis.

En primer lloc, es va comprovar el tropisme del vector AAV8 administrat intraductalment a una dosi de 1.4×10^{12} gv al pàncrees de femelles NOD de 4 setmanes d'edat, que transportava un constructe que codificava per la proteïna verda fluorescent GFP sota el control del promotor ubic CAG. Es va seleccionar aquesta edat ja que en la Part I d'aquest treball, així com en d'altres articles de la bibliografia (Norquay et al., 2009; Rosmalen et al., 2002) s'ha descrit que els illots dels animals NOD encara preserven la seva

estructura i el procés d'infiltració es troba en fases molt inicials, de manera que la majoria d'illots estan lliures d'insulitis. Per tant, seria un moment convenient per prevenir la destrucció autoimmune dels illots i preservar la massa de cèl·lula β . De manera similar al que s'havia descrit en animals CD1 de 8 setmanes, l'administració intraductal de vectors AAV8 va mostrar una àmplia transducció del pàncrees exocrí i endocrí, observant-se colocalització del marcatge GFP amb la marca d'insulina a dins de l'illot (Jimenez et al., 2011).

Tot i que la transducció parcial de la part central del *core* dels illots, pot representar un inconvenient en determinats casos, el fet que els vectors AAV8 poden transduir virtualment tots els illots del pàncrees quan són administrats a dosis de l'ordre de 10^{12} genomes virals (Jimenez et al., 2011), i que l'expressió de factors secretables com IGF-1 per les cèl·lules transduïdes pot actuar en les cèl·lules veïnes no transduïdes podria superar aquesta limitació. D'altra banda, la transducció preferent de les cèl·lules de la perifèria de l'illot seria prioritària per combatre la destrucció autoimmune de les cèl·lules β en la T1D, donat que l'atac autoimmune dels limfòcits infiltrants té lloc activament des de la perifèria de l'illot (Jansen et al., 1994; Rosmalen et al., 2002).

No obstant, l'administració intraductal de vectors AAV8 permet la transducció d'altres teixits perifèrics, principalment el fetge i el cor (Jimenez et al., 2011). Això podria ser degut a la combinació de dos factors: d'una banda, la capacitat dels vectors AAV8 de creuar barreres endotelials i assolir el torrent sanguini (Zincarelli et al., 2008); i de l'altra, l'elevada densitat vascular dels illots, que presenten una abundant microcirculació capaç de respondre a la seva funció endocrina a través de l'aportació ràpida a la sang de les hormones secretades (Konstantinova and Lammert, 2004; Lammert et al., 2003; Olsson and Carlsson, 2006). Així, una part dels vectors AAV8 administrats intraductalment és capaç d'assolir el torrent sanguini i transduir altres teixits pels quals presenta un elevat tropisme, com és el fetge (Bish et al., 2008; Inagaki et al., 2006; Nakai et al., 2005) i, en menor mesura, el cor (Pacak et al., 2006). Convé destacar que la transducció d'aquets teixits a partir d'una administració intraductal és molt menor als nivells assolits a partir d'una administració intravenosa alhora que la transferència gènica del pàncrees és superior (Jimenez et al., 2011). D'acord amb aquesta informació, l'administració intraductal de vectors AAV8 al pàncrees de femelles NOD també va resultar en una certa transducció del fetge i del cor.

Una manera d'aconseguir que l'expressió del transgèn dirigida pels vectors AAV8 estigui limitada a tipus cel·lulars específics del pàncrees és l'ús de promotors específics de teixit, com RIP-1 o RIP-2 en el cas de la cèl·lula β , o el promotor elastasa, en el pàncrees exocrí. No obstant, l'expressió dirigida per aquest tipus de promotors és més dèbil en comparació amb promotors d'origen viral com el CAG, i depèn, en molts casos, de la pròpia regulació del teixit. D'altra banda, l'administració d'un vector AAV8 amb un promotor d'expressió ubiqua permetria expressar *Igf-1* a les cèl·lules β dels illots així com maximitzar el nombre de cèl·lules acinars que proporcionarien el factor a les cèl·lules β no transduïdes. A més, d'aquesta manera, davant un atac autoimmune i destrucció selectiva d'un percentatge de cèl·lules β dels illots NOD, el pàncrees exocrí podria continuar proporcionant el factor terapèutic a les cèl·lules β restants.

Una alternativa disponible per a restringir l'expressió del transgèn al teixit d'interès és l'ús de la tecnologia dels microRNAs (miRNAs). L'expressió gènica del constructe contingut en el vector AAV pot ser modulada post-transcripcionalment mitjançant l'addició de seqüències diana de miRNAs en la part 3'-UTR. En concret, per inhibir selectivament l'expressió del transgèn en un teixit no desitjat, cal incorporar la seqüència diana d'un miRNA (miRT) específic d'aquell teixit. La seqüència diana pot ser reconeguda pel microRNA endògen del teixit i d'aquesta manera es produeix el silenciament de l'expressió (Kelly and Russell, 2009). D'acord amb això, estudis del perfil d'expressió dels miRNAs han revelat l'existència de miRNAs que són altament expressats de manera selectiva en un teixit (Shingara et al., 2005). Entre ells es troba el miRNA específic de fetge miR-122a (Chang et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002), i el miRNA específic de cor miRNA-1 (Shingara et al., 2005). Les seqüències diana dels miRNAs 122a i 1 ja han estat emprades en constructes AAV i han demostrat bloquejar de manera molt eficient l'expressió a fetge i a cor en el nostre laboratori (Jimenez et al., 2013) i en altres treballs (Geisler et al., 2011; Qiao et al., 2011). No obstant, cap d'aquests estudis s'ha dut a terme en el ratolí NOD.

Per tal de confirmar la possibilitat d'utilitzar les seqüències diana dels miRNAs 122a i 1 en el ratolí NOD per a restringir selectivament l'expressió a fetge i a cor, en aquest estudi es va mesurar l'expressió dels microRNAs 122a i 1 en els teixits d'interès del ratolí NOD. La quantificació realitzada dels nivells endògens de miRNA-122a, al fetge, i de miRNA-1, al cor, dels individus femella NOD va confirmar la seva expressió en aquests teixits. A més, en cap cas no es va detectar expressió en el pàncrees dels ratolins NOD. Els nivells d'expressió dels microRNAs es mantenien independentment de l'estadi diabètic dels

animals indicant que el bloqueig de l'expressió del constructe AAV en el fetge o el cor dels animals NOD no es perdria tot i l'avenç del procés diabètic.

Així doncs, per tal de sobreexpressar *Igf-1* localment al pàncrees dels ratolins NOD a partir d'una administració intraductal de vectors AAV8 i bloquejar l'expressió del factor al fetge i al cor, es va generar un constructe que contenia les seqüències diana del miRNA-122a i del miRNA-1 en la regió 3'-UTR (AAV8-CAG-IGF1-dmiRT). L'administració intraductal dels vectors AAV8-CAG-IGF1-dmiRT va permetre observar una clara disminució de l'expressió d'Igf-1 al fetge i al cor fins a nivells pràcticament iguals als observats en el grup control en comparació amb els animals administrats amb el vector sense les seqüències diana dels microRNAs (AAV8-CAG-IGF1). En canvi, l'expressió al pàncrees no es va veure alterada per la presència d'aquestes seqüències. Així doncs, en aquest treball s'ha validat l'ús de les seqüències diana dels microRNAs 122a i 1 en un vector AAV administrat a ratolins NOD per a modular l'expressió gènica.

Un cop generat i validat el vector terapèutic AAV8-CAG-IGF1-dmiRT es va estudiar si la seva administració a ratolins NOD de 4 setmanes d'edat era capaç de prevenir el desenvolupament de diabetis. A partir del seguiment de la glucèmia fins a les 28 setmanes d'edat, es va observar que l'increment dels nivells d'IGF-1 al pàncrees dels animals administrats amb el vector AAV8 prevenia l'inici de la hiperglucèmia i comportava una reducció significativa de la incidència de diabetis. Aquests resultats podrien indicar que els mecanismes de prevenció de la destrucció autoimmune dels illots i del manteniment de la massa de cèl·lula β observats en el ratolí transgènic NOD-IGF1, també podrien estar produint-se en el ratolí NOD administrat intraductalment amb els vectors AAV8 que codifiquen per *Igf-1*. En el nostre laboratori s'està aprofundint en aquests moments en l'estudi d'aquests animals.

En conclusió, en la Part II d'aquesta tesi s'ha demostrat que la transferència gènica d'*Igf-1* al pàncrees mitjançant l'administració intraductal de vectors AAV8 podria representar una nova aproximació terapèutica per la diabetis. Els vectors AAV8 han demostrat ser una eina molt útil per manipular genèticament el pàncrees dels ratolins NOD *in vivo* i presenten clares avantatges davant l'ús d'altres vectors. L'expressió d'*Igf-1* mitjançada per un vector adenoviral no permet estudis a llarg termini i mostra efectes limitats en la protecció de les cèl·lules β dels illots de ratolins NOD, sense observar-se una reducció de la insulinitis probablement influenciada per les propietats immunogèniques del vector (Zhang et al., 2014). Nombrosos estudis experimentals i clínics han documentat els

AAVs, en contraposició amb altres tipus de vectors com els adenovirus, com a vectors amb un potencial proinflamatori molt lleu degut a la seva incapacitat per desencadenar respostes immunes innates de manera eficient (McCaffrey et al., 2008; Stilwell and Samulski, 2004). En concret, els vectors AAV8 no semblen ser neutralitzats per antisèrum dirigit contra altres serotips d'AAV, i només nivells baixos d'anticossos neutralitzants contra AAV8 han estat detectats en subjectes humans normals (Calcedo et al., 2009; Gao et al., 2002). Això suggereix que respostes immunes aïllades com les que s'han observat al fetge després d'administrar vectors AAV2 per via intravenosa (Manno et al., 2006), estarien minimitzades amb l'ús de vectors AAV8. De fet, altres estudis ja han demostrat que l'administració intravascular de vectors AAV8 no comporta inflamació en el fetge o en el teixit adipós (Jimenez et al., 2013).

D'altra banda, l'expressió eficient i a llarg termini proporcionada per una sola administració dels vectors AAV suposa una gran avantatge respecte altres teràpies. Per exemple, degut a la curta vida mitja d'IGF-1 en circulació (Le Roith, 1997), el tractament amb proteïna IGF-1 recombinant requereix una administració constant i repetida del factor i, a més, els seus efectes tenen una duració limitada un cop s'interromp el tractament (Kaino et al., 1996).

Finalment, l'administració intraductal podria ser aplicada potencialment a animals més grans i a humans, per mitjà del procés clínic no quirúrgic i menys invasiu de la colangiopancreatografia endoscòpica retrògrada (ERCP) (Hendrick et al., 2011), obrint la possibilitat d'extrapolar aquest tractament amb èxit en humans. A més, l'eficàcia i seguretat de la transferència gènica mitjançada per vectors AAV ha estat extensament estudiada en humans, amb resultats prometedors al fetge, múscul, sistema nerviós central i la retina (Mingozzi and High, 2011). No obstant, caldrien més estudis en animals grans diabètics abans que una aproximació terapèutica com la descrita en aquest treball pugui ser aplicada a pacients humans.

VI. CONCLUSIONS

PART I: ESTUDI DEL PAPER D'IGF-1 EN LA PRESERVACIÓ DE LA MASSA DE CÈL·LULA β EN EL MODEL ESPONTANI DE DIABETIS AUTOIMMUNE NOD

- 1) La sobreexpressió d'IGF-1 a les cèl·lules β dels ratolins transgènics NOD-IGF1 era capaç de prevenir el desenvolupament de diabetis autoimmune per mitjà d'un efecte local autocrí/paracrí d'IGF-1 al pàncrees.
- 2) El manteniment de la massa de cèl·lula β i de la tolerància a la glucosa observat en els animals NOD-IGF1 era degut principalment a una reducció de l'apoptosi de la cèl·lula β .
- 3) Els ratolins transgènics NOD-IGF1 presentaven una important reducció del procés inflamatori en els illots, associada a una reducció de la insulitis, una menor expressió de citoquines inflamatòries i menor expressió de molècules presentadores d'antigen. Això feia que, amb l'edat, els ratolins NOD-IGF1 estiguessin protegits de la destrucció autoimmune dels illots.
- 4) La sobreexpressió d'IGF-1 podria conduir a un augment de les cèl·lules Treg al pàncrees i als nòduls limfàtics pancreàtics dels ratolins NOD-IGF1, fet que contribuiria al manteniment de la tolerància immune en els illots.
- 5) Tots els resultats anteriors suggerien que la sobreexpressió d'IGF-1 als illots pancreàtics podria ser una aproximació terapèutica indicada per frenar i prevenir l'atac autoimmune dels illots en la T1D i promoure la supervivència de la cèl·lula β durant el procés diabètic. Per tant, *Igf-1* seria un possible gen candidat al desenvolupament d'estratègies de teràpia gènica per a contrarestar la diabetis.

PART II: APROXIMACIÓ DE TERÀPIA GÈNICA DIRIGIDA AL PÀNCREES BASADA EN LA TRANSFERÈNCIA GÈNICA D'IGF-1 PER CONTRARRESTAR LA DIABETIS AUTOIMMUNE EN EL RATOLÍ NOD

- 1) L'administració intraductal de vectors AAV8-CAG-GFP a ratolins NOD va resultar en una transducció eficient del pàncrees exocrí i endocrí. No obstant, aquesta administració va permetre també la transducció del fetge i del cor.
- 2) Els ratolins NOD presentaven nivells elevats d'expressió del microRNA-122a al fetge, i del microRNA-1 al cor, independentment de l'estadi diabètic. No obstant, l'expressió d'aquests microRNAs no va ser detectable al pàncrees dels ratolins NOD.
- 3) L'ús dels vectors AAV8 en combinació amb la tecnologia de les seqüències diana dels microRNAs 122a i 1 va ser una estratègia molt eficient per sobreexpressar IGF-1 al pàncrees dels ratolins NOD i bloquejar l'expressió als teixits no desitjats (fetge i cor) mitjançant una administració intraductal del vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT.
- 4) La sobreexpressió d'IGF-1 al pàncrees mitjançada per l'administració intraductal del vector AAV8-CAG-IGF1-dmiRT protegia els ratolins NOD del desenvolupament espontani de diabetis i reduïa la incidència de diabetis.
- 5) La transferència gènica d'IGF-1 al pàncrees mitjançant l'administració intraductal d'un vector AAV8 podria representar una nova aproximació de teràpia gènica per la diabetis tipus 1.

VII. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Animals

Els ratolins NOD RIP-1/IGF1 van ser obtinguts a partir de retrocreuaments successius entre mascles ICR RIP-1/IGF-1, generats prèviament al laboratori (George et al., 2002), i femelles NOD (Charles River Laboratories, Barcelona, Espanya). Després de 20 generacions es va considerar un fons genètic 100% NOD. Els experiments presentats en aquest treball s'han dut a terme a partir d'animals transgènics NOD RIP-1/IGF-1 generats en el retrocreuament N15 en endavant (%NOD > 99.99%).

Per a l'estudi de la funcionalitat de la seqüència diana del microRNA-122a es van utilitzar ratolins ICR (Harlan Teklad, Barcelona, Espanya) mascles de 8 setmanes d'edat.

Els ratolins van ser estabulats en instal·lacions lliures de patògens (SER-CBATEG), en condicions de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) i llum controlades (cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor), i alimentats *ad libitum*, és a dir, sense restringir-los l'accés al menjar, amb una dieta estàndard (2019S Teklad Global; Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EEUU).

Per a la presa de mostres, els animals van ser anestesiats mitjançant anestèsics inhalatoris (Isoflurano, IsoFlo®, Abbott Animal Health, Illinois, EEUU) i van ser eutanasiats per decapitació. Les mostres de sang i teixits van ser preses entre les 9:00 i les 11:00 del matí i immediatament van ser congelades amb N₂ líquid i guardades a -80°C (sangs i teixits) o van ser conservades en formol (teixits).

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

1.2. Soques bacterianes

Les soques *E.coli XL2Bue* (Stratagene-Agilent tecnologies, Santa Clara, CA, EEUU) es van utilitzar per obtenir els diferents constructes plasmídics utilitzats en aquest treball. Tots els plasmidis contenen el gen de la resistència a l'ampicil·lina per a ser seleccionats. El cultiu bacterià es va fer créixer en medis de LB sòlid (Miller's LB Broth, Conda, Madrid, Espanya) amb 2 % d'agar i 50 µg/ml d'ampicil·lina.

1.3. Anticossos

Les mostres de teixits van ser fixades amb una solució tamponada de formol al 4%, incloses en blocs de parafina i posteriorment es van obtenir seccions de 2-3µm per a realitzar la incubació amb els anticossos corresponents. Els anticossos i reactius utilitzats per a la detecció de proteïnes mitjançant tècniques immunohistoquímiques, Western blot o citometria de flux es resumeixen en la taula següent:

	Reactivitat	Espècie	Proveïdor
Immunohistoquímica			
Anti-insulina	Ratolí	Conill	Sigma-Aldrich I-8510
Anti-glucagó	Ratolí	Conill	Signet 219-01
Anti-IGF-1	Ratolí	Cabra	R&D Systems AF791
Anti-GFP	Ratolí	Cabra	Abcam ab6673
Anti-Ki67	Ratolí	Conill	BD Pharmingen 55069
Anti-somatostatina	Humà	Conill	Serotec 150597
Anti-polipèptid pancreàtic	Humà	Conill	ICN BioMedicals 64711
TUNEL <i>kit</i>			Roche 1.684817
Anti-cabra Ig biotinitat	Cabra	Ase	Santa Cruz sc-2042
Anti-conill Igbiotinitat	Conill	Cabra	Pierce 31820
Streptavidine AlexaFluor 488			Life Technologies 11223
3,3-Diaminobenzidina (DAB)			Sigma-Aldrich D5637-1G
DAPI			Sigma-Aldrich D9542
Western Blot			
AKT-PSer ⁴⁷³		Conill	Cell Signaling 9271
AKT total		Conill	Cell Signaling 9272
Citometria de flux			
PE Anti-CD4	Ratolí	Rata	BioLegend # 100407
FITC Anti-CD25	Ratolí	Rata	BD # 553071
Alexa-647 Anti-FoxP3 Flow kit	Ratolí		BioLegend # 320021

La Streptavidina conjugada amb Alexa Fluor 488 (FITC) (Life Technologies) i la 3,3-Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich) van ser utilitzades per imatges en fluorescència i camp clar, respectivament. Les seccions van ser incubades amb DAPI (Sigma-Aldrich) per al marcatge fluorescent dels nuclis. En el cas de les imatges DAB en camp clar es va utilitzar la contratinció amb hematoxilina únicament.

1.4. Reactius

Els reactius de biologia molecular es van obtenir de les cases comercials Roche (Roche Diagnostics Corp., IN, EEUU), Invitrogen Corporation (actualment Life Technologies) (San Diego, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St.Louis, MO, EEUU), Promega Corporation (Madison, WI, EEUU), BASF (Barcelona, Espanya), Qiagen (Hilden, Alemanya), QBIOgen (actualment MP Biomedicals) (Irvine, CA, EEUU) i Fermentas (St. Leon-Rot, Alemanya). Els medis de cultiu i els antibiòtics es van obtenir de PAA (Pasching, Austria) i el sèrum (FBS) de Gibco (Invitrogen, Life Technologies).

1.5. Plasmidis

Els plasmidis utilitzats en aquest estudi es resumeixen en la següent taula:

Nom	Promotor	Gen d'interès	PolyA
pAAV-CAG-GFP	CAG	GFP	β -globina de conill
pAAV-CAG-NUL	CAG	-	β -globina de conill
pAAV-CAG-IGF1-dmiRT	CAG	mIGF1 miRT122a miRT1	β -globina de conill
pAAV-CAG-IGF1	CAG	mIGF1	β -globina de conill

El promotor CAG és un promotor híbrid format pel promotor de la β -actina de pollastre i per l'*enhancer* del Citomegalovirus i presenta una expressió ubiqua.

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

Nom	Estratègia de clonatge	
pAAV-CAG-GFP	CBATEG	
pAAV-CAG-NUL	CBATEG	
pAAV-CAG-IGF1-dmiRT	vector	pAAV-CAG-GFP-dmiRT (CBATEG) digerit amb HindIII i NotI.
	insert	pAAV-CAG-IGF1 digerit amb HindIII i NotI.
pAAV-CAG-IGF1	vector	pAAV-CAG-IGF1-dmiRT digerit amb BamHI/KpnI i extrems roms.

3. MÈTODES

2.1. Tècniques bàsiques de DNA

2.1.1. Preparació del DNA plasmídic

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

D'altra banda, l'obtenció de grans quantitats de DNA es va realitzar mitjançant *maxipreparacions (maxipreps)*, a partir de les quals s'obté com a màxim 1 mg de plasmidi de DNA, o *megapreparacions (megapreps)* per a obtenir un màxim de 2.5 mg de plasmidi de DNA, a partir de 250 ó 500 ml de medi de cultiu, respectivament. El mètode està basat igualment en la lisi alcalina, però la purificació de DNA, en aquest cas, es va realitzar mitjançant columnes d'adsorció *PureYield™ Plasmid MaxiPrep System* (Promega Corporation) per les *maxipreps*, o *EndoFree Plasmid Mega Kit* (Qiagen) per a les *megapreps*.

2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció

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

2.1.3. Desfosforilació de fragments de DNA

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

2.1.4. Generació d'extrems roms de fragments de DNA

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

2.1.5. Construcció de molècules híbrides: lligació

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

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

El plasmidi de DNA pot ser introduït a cèl·lules bacterianes competents a través de la transformació. En aquest estudi, l'electroporació va ser el mètode escollit per a dur a terme la transformació de les cèl·lules *E.coli* XL2-blue. 40µl de cèl·lules competents (2×10^{10} cèl·lules/ml) van ser descongelades en gel fins a la seva utilització. 1 µl (aproximadament 10 ng) de la reacció de lligació del DNA o de DNA control va ser afegit directament a les cèl·lules competents. Després de la incubació en gel durant 5 minuts, les

cèl·lules van ser electroporades a 2500 V amb un electroporador (Bio-Rad). Posteriorment, es van diluir en 200 µl de LB, es van sembrar en plaques amb LB amb l'antibiòtic corresponent i van ser incubades a 37°C O/N (durant tota la nit). Al matí següent es van fer créixer les colònies de bacteris obtingues i posteriorment es va extreure el DNA de les colònies recombinants. Mitjançant l'ús d'enzims de restricció es va analitzar la presència de les molècules híbrides de DNA.

2.1.7. Obtenció del DNA i purificació

El gel d'electroforesi d'agarosa és el mètode estàndard utilitzat per separar, identificar i purificar els fragments de DNA. Per separar fragments de DNA entre 0.2 i 7 kb es van utilitzar gels d'agarosa a l'1 %. Per separar fragments <0.2 kb es van utilitzar gels d'agarosa al 2%. La visualització del DNA en el gel es va aconseguir mitjançant l'addició de baixes concentracions de Bromur d'Etidi fluorescent al gel (0.5 µg/ml), el qual s'intercala entre les dues cadenes del DNA. La presència de DNA es va visualitzar utilitzant llum ultraviolada (UV) de baixa longitud d'ona (310 nm) a través d'un transiluminador i un sistema de càmeres (Syngene). Com a marcador de mida molecular de DNA es va utilitzar el *DNA ladder 1kb* (Invitrogen).

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

2.2. Cèl·lules eucariotes en cultiu

2.2.1. Cèl·lules *Ins-1*

Les cèl·lules *Ins-1* (ATCC) provenen d'un insulinoma de rata. Per al seu cultiu, les cèl·lules *Ins-1* van ser incubades a 37 °C, al 8.5 % de CO₂ i en medi de cultiu RPMI-1640 (PAA) (10 mM de glucosa) amb 2 mM de Glutamina, suplementat amb FBS (*Fetal Bovine Serum*, PAA) al 10% (inactivat per calor), 10 mM HEPES, 1mM de Piruvat sòdic i 50µM de 2-Mercaptoetanol. Per a realitzar els passos de manteniment, les cèl·lules *Ins-1* van ser tripsinitzades per provocar la desadhesió de la placa, i després es van tornar a plaquejar a diferents dilucions.

2.2.2. Cèl·lules C2C12

La línia cel·lular C2C12 (ATCC) prové d'una línia immortalitzada de mioblasts de ratolí. El manteniment de les cèl·lules es va realitzar en medi DMEM (PAA) amb 2µM de Glutamina i suplementat amb FBS al 10% (inactivat per calor). Per induir la seva diferenciació a miotubs, es va utilitzar el mateix medi de cultiu però suplementat amb HS (*Horse Serum*, PAA) al 2% (inactivat per calor) enlloc de FBS al 10%. En ambdós casos es van cultivar a l'incubador a 37°C i al 8.5% de CO₂.

2.2.3. Cèl·lules HEK-293

Les cèl·lules HEK-293 ó 293 (ATCC) són cèl·lules embrionàries de ronyó humà que presenten el gen adenoviral E1 de l'Ad5 integrat de forma estable en el genoma cel·lular. Aquestes cèl·lules van ser utilitzades per a l'amplificació dels vectors virals. Es van mantenir en medi de cultiu DMEM (PAA) amb 2 mM de Glutamina, suplementat amb FBS al 10% (inactivat per calor) en un incubador ajustat al 8.5 % de CO₂ i a 37 °C. Quan tenien una confluència del 70 %, les cèl·lules van ser tripsinitzades i plaquejades a diferents dilucions.

2.2.4. Transfecció de DNA en cèl·lules en cultiu

Per a dur a terme l'anàlisi d'expressió *in vitro* dels constructes obtinguts es van realitzar transfeccions dels plasmidis a diferents línies cel·lulars (Ins-1, C2C12).

Per a aquesta finalitat es va utilitzar la tècnica de transfecció amb Lipofectamina (Lipofectamine™2000, Invitrogen), la qual es basa en la formació d'un complex Lipofectamina-DNA per tal d'afavorir l'entrada del DNA a la cèl·lula. La proporció de Lipofectamina/DNA utilitzada va ser de 2.5 µl de Lipofectamina (1mg/ml) per 1 µg de DNA en les cèl·lules Ins-1 i de 10 µl de Lipofectamina (1mg/ml) per 4 µg de DNA en les cèl·lules C2C12. En el moment de la transfecció, les cèl·lules INS-1 i C2C12 estaven al 70-80% de confluència. Al cap de 4-6h post-transfecció, es va canviar el medi de les cèl·lules Ins-1 per medi de cultiu fresc. En canvi, a les cèl·lules C2C12 es canvià el medi igualment, però en aquest cas pel medi de diferenciació DMEM (PAA) amb 2mM de Glutamina i suplementat amb HS (*Horse Serum*, PAA) al 2% (inactivat per calor). El cultiu de les cèl·lules es va interrompre a les 48h post-transfecció, en el cas de les Ins-1, i als 6 dies post-transfecció i inducció del procés de diferenciació, en el cas de les cèl·lules C2C12, per a l'anàlisi de les mostres.

2.3. Genotipació dels animals transgènics NOD-IGF1

Els ratolins NOD-IGF1 van ser genotipats mitjançant PCR sobre DNA genòmic per a detectar l'expressió del gen IGF-1 murí transgènic.

2.3.1. Purificació del DNA genòmic dels ratolins

L'obtenció del DNA genòmic es va fer a partir de mostres de cua (~0,5 cm de longitud) de ratolins de 3 – 4 setmanes d'edat, segons una adaptació del mètode d'extracció descrit per Wet i col·laboradors (de Wet et al., 1987). Breument, els fragments de cua eren digerits O/N a 56°C en una solució tamponada suplementada amb 0,1% w/v de proteïnasa K (*Roche*) (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,2% w/v SDS; 200 mM NaCl; 1 mg/ml Proteïnasa K). Aquesta incubació va permetre la digestió tissular i l'alliberació del DNA genòmic de l'interior cel·lular. L'homogenat (700 µl) va ser posteriorment clarificat per addició d'una solució saturada de NaCl (250 µl) i centrifugat durant 15 min a 12000xg. El sobrenedant es va separar i el DNA genòmic es va purificar per precipitació amb 500 µl d'isopropanol. Posteriorment es va realitzar una nova centrifugació durant 15 min a 12000xg per afavorir la precipitació del DNA genòmic al fons del tub. Aquest *pellet* de DNA va ser finalment rentat mitjançant dos rentats amb etanol 70% v/v i re-suspès en 50 µl de H₂O Milli-Q prèviament escalfada a 65°C per facilitar la solubilització del DNA.

2.3.2. Genotipació per PCR

La genotipació es va dur a terme mitjançant el *kit* comercial de PCR *GoTaq® DNA Polymerase (M300)* (*Promega*) en un volum final de 25 µl:

Reacció de genotipat	Volum
5x <i>GoTaq Reaction Buffer</i>	5 µl
Mg ²⁺ (25 mM)	2.4 µl
dNTPs (25 mM)	0.2 µl
<i>Primer forward</i> (10 µM)	1 µl
<i>Primer reverse endògen</i> (10 µM)	1 µl
<i>Primer reverse transgènic</i> (10 µM)	1 µl
<i>GoTaq Polimerasa</i> (5U/µl)	0.2 µl
H ₂ O Milli-Q	11,2 µl
DNA genòmic (1/200)	3 µl

La reacció consistia en una desnaturalització inicial d'1 min a 95°C, seguida de 30 cicles de (a) desnaturalització (15s a 95°C), (b) hibridació (30s a 60°C) i (c) elongació (20s

a 72°C), amb una fase final comú d'elongació d'1 min a 72°C. Els *primers* utilitzats per la genotipació van ser:

- *Forward*: 5' TGG ATG CTC TTC AGT TCG TG 3'
- *Reverse endògen*: 5' GAG GGT GGC TGT TAG CCA TA 3'
- *Reverse transgènic*: 5' GCA ACA CTC ATC CAC AAT GC 3'

Els resultats d'amplificació d'aquesta reacció de PCR eren una banda d'aproximadament 190 pb per als ratolins NOD, i una doble banda de 190 pb i 100 pb per als ratolins transgènics NOD-IGF1. Finalment, el resultat d'amplificació de la PCR es carregava en un gel d'electroforesi d'agarosa al 2% w/v, com s'especifica a la apartat 2.1.7 de Materials i Mètodes.

2.4. Producció, purificació i titulació dels vectors virals adenoassociats

2.4.1. Producció i purificació

Les partícules infectives de vectors virals AAV8 es van generar en cultius cel·lulars HEK-293 cultivats en *Roller Bottles* (RB) mitjançant un protocol de triple transfecció (Ayuso et al., 2010a) que implica la utilització de 3 plasmidis. Aquest protocol basat en la precipitació dels virus mitjançant polietilenglicol (PEG) i ultracentrifugació amb gradients de CsCl permet eliminar pràcticament el contingut de càpsides buides i disminuir les impureses proteiques, augmentant d'aquesta manera la puresa de la preparació viral final, la qual cosa resulta en nivells de transducció *in vivo* més elevats (Ayuso et al., 2010b).

La co-transfecció de cada RB es va dur a terme en 30 mL de fosfat càlcic amb 150 µg del DNA plasmídic d'interès (amb les seqüències ITR i el *cassette* d'expressió corresponent), juntament amb 150 µg del plasmidi accessori rep2/cap8 (plasmidi d'expressió codificant per les proteïnes de la càpsida proteica de les partícules virals i per les proteïnes necessàries per la replicació viral; Plasmid Factory) i 150 µg del plasmidi *helper* pWEAD (plasmidi d'expressió codificant per a les proteïnes adenovirals necessàries; Plasmid Factory).

Un total de 10 RB per cada vector AAV8-CAG-IGF1, AAV8-CAG-NUL i AAV8-CAG-IGF1-dmiRT, i 20 RB per a AAV8-CAG-GFP es van utilitzar per a la producció viral. 48 hores post-transfecció, es van recollir i centrifugar les cèl·lules a 2500 g durant 10 min. El medi de cultiu es va guardar a 4°C. El *pellet* cel·lular es va reconstituir en TMS (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2mM MgCl₂, pH 8.0) i es va sonicar per lisar les cèl·lules i alliberar els virus del seu interior. El lisat es va centrifugar a 2500 g durant 30 min, i el sobrenedant d'aquesta centrifugació es va afegir al medi de cultiu prèviament guardat a 4 °C. A

continuació, les partícules virals es van precipitar mitjançant una incubació de 15h en PEG 8000 al 8% (*Sigma*) a 4 °C. Passat aquest període, els vectors es van precipitar per centrifugació a 4000 g durant 30 min. Aquest nou *pellet*, que contenia els vectors virals tant del medi de cultiu com de les cèl·lules, va ser reconstituït amb TMS, tractat amb benzonasa (*Merck*) durant 1h a 37°C i finalment centrifugat a 10.000 g durant 10 min. El sobrenedant resultant es va carregar en tubs de 37.5 ml *Ultra clear* (*Beckman*) que contenien un gradient discontinu de CsCl de densitat 1.5 (5ml) i 1.3 g/ml (10ml). A continuació, van ser centrifugats durant 17 h a 27000 rpm en un rotor SW28 (*Beckman*). Les bandes de virus van ser recollides mitjançant agulles de 18 G i es van transferir a tubs *Ultra clear* de 12.5 ml. La resta del tub de 12.5 ml es va emplenar amb CsCl a 1.379 g/ml per tal de generar un gradient continu. Aquests tubs es van centrifugar a 38000 rpm en un rotor SW40Ti (*Beckman*) durant 48 h. Finalment, es van recollir i dialitzar les bandes corresponent a les partícules virals plenes mitjançant una membrana de 10 kDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Products, Pierce*), i posteriorment es van filtrar mitjançant filtres de 0.22 µm (*Millipore*).

2.4.2. Titulació de genomes virals

Els genomes virals dels AAV8 van ser determinats per PCR quantitativa (qPCR) adequant el protocol descrit pel *AAV2 i AAV8 Reference Standard Material* (Lock et al., 2010) als vectors utilitzats en aquest estudi. La quantificació de cada vector es va fer en paral·lel amb un vector de referència de concentració coneguda per garantir la validesa dels resultats.

Com a corba estàndard es va fer servir un plasmidi linealitzat i quantificat mesurant l'absorbància a 260 nm. Per assegurar que el títol del vector viral no se sobreestimava degut a la presència de plasmidis de DNA restants de la transfecció a la preparació viral final, es va realitzar un tractament amb DNAsa previ a la quantificació. Només els genomes encapsidats són resistents a la digestió amb DNAsa.

Es van afegir 5 µl de cada preparació del vector viral en 5 µl de tampó de DNAsa 10X (130 mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 1,2mM CaCl₂, pH 7,5), 1 µl de DNAsa (10 U/µl) i 36 µl d'aigua Milli-Q. La digestió es va incubar 60 min a 37 °C. Després de la digestió les mostres es van diluir per a obtenir un valor d'amplificació dins del rang de la corba estàndard. Cada reacció de qPCR TaqMan contenia en un volum final de 10 µl:

Reacció TaqMan	Volum
<i>TaqMan LightCycler® 480 Probe Master</i>	5 µl
<i>Primer forward</i> (10 µM)	0.2 µl
<i>Primer reverse</i> (10 µM)	0.2 µl
Sonda (10 µM)	0.1 µl
H ₂ O Milli-Q	2 µl
Vector diluït	2.5 µl

La reacció consistia en una incubació inicial de 10 min a 95°C (que permet l'activació de la polimerasa i la desnaturalització de les càpsides virals, permetent l'alliberament del genomes) seguida de 40 cicles de 30s a 95°C (desnaturalització) i 30s a 60°C (*annealing* i elongació).

Els *primers* utilitzats en la quantificació dels genomes virals dels AAV hibridaven a la zona comú del polyA (intró β-globina):

Forward: 5' CTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAAT 3'

Reverse: 5' GGAGAGGAGGAAAAATCTGGCTAG 3'

Sonda: 5' CCGAGTGAGAGACACAAAAAATCCAACAC 3'

El títol viral assignat va ser el resultat de la mitjana de tres quantificacions realitzades en dies diferents:

Vector viral	Títol (gv/ml)
AAV8-CAG-GFP	8.7x10 ¹³
AAV8-CAG-NUL	1.4x10 ¹³
AAV8-CAG-IGF1	9.8x10 ¹³
AAV8-CAG-IGF1-dmiRT	1.3x10 ¹³

2.4.3. Quantificació de les partícules virals per tinció de plata

L'anàlisi de les preparacions virals per electroforesi de proteïnes SDS-PAGE i la posterior tinció amb nitrat de plata permet la quantificació de les càpsides virals, que comparat amb el valor de genomes virals obtinguts per qPCR (veure apartat 2.4.2), permet calcular el percentatge de càpsides buides en cada preparació (relació: partícules virals / genomes virals). A més a més, aquest mètode permet visualitzar al gel el grau de contaminació de proteïnes no virals que podrien afectar l'eficiència de transducció *in vivo*.

El volum apropiat del vector d'interès, del vector de referència (control utilitzat també en la quantificació per qPCR) i de diferents dilucions del vector K208 (de concentració coneguda i utilitzat com a corba estàndard), es van barrejar amb el tampó 4x *Novex® Tris-Glycine LDS Sample Buffer (Invitrogen)* i 10x *NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)* fins a un volum final de 20 µl. Després de 5 minuts d'ebullició, les mostres es

van carregar en un gel del *10% Bis-Tris Gel 1,5mm 15 well (Invitrogen)* i es van córrer a 120 V durant 2 hores. Les proteïnes del gel van ser fixades amb una barreja de Milli-Q H₂O/etanol/àcid acètic. A continuació, el gel es va *sensibilitzar* amb una barreja de Na₂S₂O₃/Acetat de sodi/etanol/H₂O Milli-Q. Finalment, el gel es va tenyir amb nitrat de plata i les bandes es van revelar fent servir una barreja de Na₂CO₃ /Formaldehid/H₂O Milli-Q.

El títol de partícules virals es va obtenir per densitometria. A partir de la intensitat de la VP3 de cada dilució del vector K208 es va generar una corba estàndard per quantificar les partícules virals de les diferents preparacions.

2.5. Determinació de genomes virals en teixits per qPCR

El valor final del nombre de genomes virals que han transduït una determinada cèl·lula, és alhora representatiu del nombre de còpies del transgèn per cèl·lula. La determinació de genomes virals es va obtenir a partir de la comparació de 20 ng de DNA genòmic extret de diferents teixits de ratolins, amb una recta patró de referència generada a partir de dilucions seriades del plasmidi linealitzat.

2.5.1. Generació de la recta patró de referència

La recta patró es va generar a partir del DNA plasmídic pAAV-CAG-GFP-WPRE linealitzat. Per tant, coneixent la concentració del plasmidi i el nombre de parells de bases del constructe (7772 pb), es va obtenir el nombre de còpies del transgèn per µl. Aquest DNA plasmídic es va diluir de forma seriada de manera que s'obtingués una recta patró de dilucions logarítmiques 10⁷:10⁶:10⁵:10⁴:10³:10² còpies del transgèn/µl. A cada reacció de PCR es va combinar el DNA plasmídic amb 20 ng de DNA genòmic total irrellevant (no transgènic) de ratolí amb la finalitat d'igualar les condicions de PCR entre la recta patró i el DNA genòmic dels ratolins transgènics.

2.5.2. Quantificació del nombre de còpies del transgèn per qPCR

Un cop generada la recta patró i diluïdes les mostres, es va realitzar la qPCR per al càlcul del nombre de còpies del transgèn. Cada reacció de qPCR (*TaqMan LightCycler® 480 Probe Master, Roche*) es va dur a terme en 20 µl de volum final:

Reacció TaqMan	Volum
<i>TaqMan LightCycler® 480 Probe Master</i>	10 µl
<i>Primer forward</i> (10 µM)	1 µl
<i>Primer reverse</i> (10 µM)	1 µl
Sonda (10 µM)	0.2 µl
H ₂ O Milli-Q	6.8 µl
Vector diluït	1 µl

La reacció de qPCR va consistir en una desnaturalització inicial de 10 min a 95°C i 45 cicles de desnaturalització (10 s 95°C), *annealing* (30 s a 60°C) i amplificació (1 s a 72°C). Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats s'especifiquen a continuació:

Forward: 5' CTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAAT 3'

Reverse: 5' GGAGAGGAGGAAAAATCTGGCTAG 3'

Sonda: 5' CCGAGTGAGAGACACAAAAAATCCAACAC 3'

Els valors obtinguts a la qPCR en relació a la recta patró van proporcionar el nombre de còpies del transgèn que hi havia inicialment en 20 ng de DNA genòmic total. Sabent que en ratolí, 20 ng de DNA genòmic corresponen a 3115.26 cèl·lules diploides, es va obtenir el nombre de còpies del transgèn per cèl·lula diploide.

2.6. Injecció *in vivo* dels vectors virals

2.6.1. Administració retrògrada pel ducte pancreaticobiliar

La injecció retrògrada pel ducte pancreaticobiliar va ser realitzada seguint el protocol descrit per Loiler i col·laboradors (Loiler et al., 2005) amb petites modificacions. Els animals es van anestesiar mitjançant una injecció intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) i xilacina (10 mg/kg). Es va afaitar la zona ventral del ratolí i es va realitzar una incisió de 2-3 cm a través de la línia mitjana, començant a l'alçada del cartílag xifoides i continuant cabdalment. Tot seguit, es va procedir a l'obertura de l'abdomen per mitjà d'una incisió a través de la línia alba i es va col·locar un separador abdominal. Amb cura, es van exposar al camp quirúrgic el duodè i el cap del pàncrees, identificant-se el ducte biliar. Es van apartar els lòbuls del fetge i es va pinçar el ducte biliar cabdalment al fetge, a la zona de bifurcació de la triada hepàtica per tal de prevenir la disseminació del vector viral cap al fetge. Posteriorment, es va introduir una agulla de 30G a través de la papil·la de Vater i es va avançar retrògradament pel ducte biliar. L'agulla es va fixar pinçant el ducte a l'alçada de l'intestí per assegurar la seva posició i evitar la fuga de vectors virals a l'intestí (Figura 64). Lentament, es va injectar un volum total de 100 µl amb la dosi corresponent

de vectors virals. Un minut després de la injecció, es va retirar la pinça que assegurava l'agulla i es va aplicar una gota d'adhesiu quirúrgic veterinari Histoacryl (Braun) al punt d'entrada de l'agulla. Aproximadament dos minuts després es va retirar la pinça del ducte biliar i es va suturar la paret abdominal i la pell. Els ratolins es van deixar recuperar de l'anestèsia en una manta calefactora per evitar la pèrdua de temperatura.

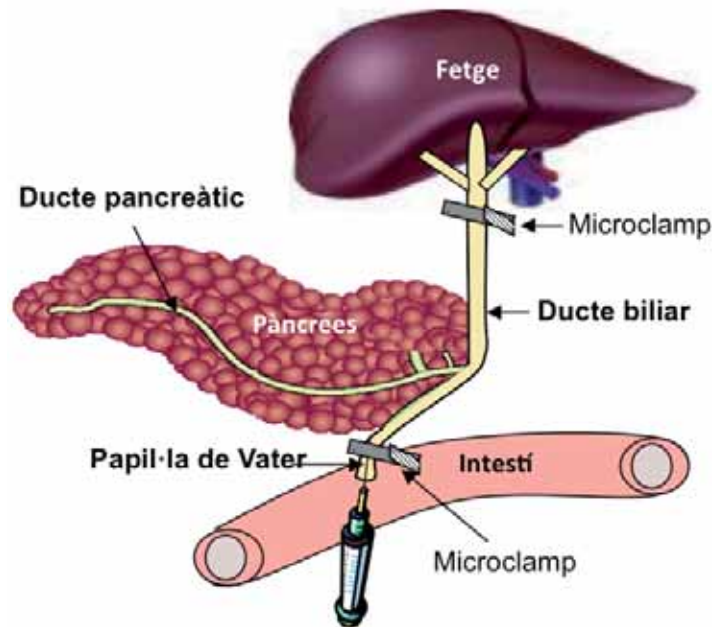


Figura 64. Representació esquemàtica de la xeringa i la col·locació del microclamp per a la injecció intraductal retrògrada de vectors virals al pàncrees a través del conducte biliar. La solució que conté els vectors virals s'injecta a través de la papil·la de Vater utilitzant una agulla de 30G. El primer microclamp es col·loca al conducte biliar tallant la circulació vascular cap al fetge i la segona pinça s'utilitza per a fixar l'agulla de la xeringa per tal d'evitar la disseminació dels vectors virals cap a l'intestí.

2.6.2. Administració hidrodinàmica

L'administració hidrodinàmica per la vena de la cua es va realitzar com s'ha descrit anteriorment (Liu et al., 1999). El plasmidi de DNA es va diluir en una solució salina en volum (ml) igual al $\sim 10\%$ del pes corporal mitjà (g) dels animals i es va injectar manualment a la vena lateral de la cua en menys de 5 segons. Abans de la injecció, els animals van ser exposats sota una llum d'infraroig de 250W (Philips) durant uns minuts per dilatar els vasos sanguinis i facilitar la visualització i facilitar l'accés a la vena de la cua. Es van col·locar els animals en un *rastrainer* de plàstic (Harvard Apparatus) per immobilitzar-los i facilitar la injecció. Es van utilitzar agulles de 30G (BD).

La injecció per la vena de la cua com més proximal al cos millor ja que s'aprofita la dilatació natural del vas a mesura que entra a l'abdomen i augmenta la taxa d'injecció. No obstant, si falla la injecció (un problema que pot passar, és que immediatament la regió que envolta el lloc d'injecció es blanqueja), no és possible dur a terme una altra injecció

més distal en la mateixa línia lateral. Si això passa, l'animal es pot injectar a través de la vena de la cua contra lateral o a través de la vena original després de dues hores.

En general, els ratolins van tolerar les injeccions hidrodinàmiques bé, però immediatament després els ratolins normalment restaven immòbils i manifestaven una respiració forçada que persistia durant pocs minuts. A part d'aquests efectes immediats de la injecció hidrodinàmica, els animals no van patir conseqüències conegudes durant el tractament.

2.7. Aïllament d'illots pancreàtics

Els illots pancreàtics s'extreien a partir de la digestió del pàncrees i posterior aïllament dels illots. Per tal de digerir els pàncrees, els ratolins es sacrificaven i se'ls perfonia el pàncrees mitjançant la injecció, via el conducte biliar comú i la circulació clampada per l'ampul·la de Vatter, amb 3 ml d'una solució de Liberasa (Roche; 0.104mg/ml en medi sense sèrum M199 (Gibco – Life Technologies #10012-037). Un cop perfosos els pàncrees es mantenien en gel fins a ser digerits en la mateixa solució que s'havia preparat per les injeccions a 37°C durant 19 minuts. Per aturar la digestió i diluir l'enzim s'afegien 35 ml de medi M199 fred amb el 10% de sèrum (Biowest #S0250-500) i s'agitava durant 30s per acabar de disgregar completament el teixit. Seguidament es feien 2 rentats amb 30 ml i 10ml, respectivament, amb medi M199 complementat amb sèrum i eren filtrats (450mm PGI 34-1800-09) i recol·lectats en un nou tub. El filtrat amb 10 ml de medi amb sèrum, era centrifugat (Eppendorf 5810R, rotor A-4-62) a 200-230xG, 5 minuts a 4°C. El sobrenedant era descartat i després d'eliminar totes les restes de medi, es resuspensia el precipitat amb 13ml d'Histopaque-1077 (Sigma 10771) fresc amb la pipeta i fins a un volum de 25 ml s'afegia medi M199 sense sèrum sense que es barreassin les dues fases. Seguidament era centrifugat (Eppendorf 5810R) a 1000xG durant 24 minuts a 4°C per tal d'obtenir els illots pancreàtics a la interfase entre el medi i l'Histopaque i així, amb la pipeta ser recol·lectats. Un cop aïllats els illots eren rentats dos cops amb 40 ml de medi amb sèrum i centrifugats a 1400 rpm, 2.5 minuts i a temperatura ambient. En l'últim rentat el pellet d'illots era resuspès en 10-15 mL de medi M199. En aquest pas, i per ajudar a la seva identificació sota la lupa, els illots eren tenyits mitjançant l'addició de 200 µl d'una solució de Ditizona (Fluka #43820) al medi (per 10ml de volum: 30 mg Ditizona, 9 ml EtOH absolut, 150 µl NH₄OH i 850 µl H₂O). Trancorreguts 5 min d'incubació, els illots eren transferits a una placa de petri per ser pescats sota la lupa binocular.

Un cop recuperats, els illots eren processats per a la corresponent extracció de RNA (veure apartat 2.8.2 de Materials i Mètodes) o de proteïna (veure apartat 2.10.1 de

Materials i Mètodes). Per a la determinació del contingut d'IGF-1 dels illots per ELISA, els illots pescats de cada animal es van transferir a una placa de 12 pous on van cultivar a 37 °C, al 8.5 % de CO₂ en un volum de 500 µl de medi RPMI-1640 (PAA), 11 mM glucosa, 1% BSA, P/S, 2mM Glutamina, 0.1 mg/mL aprotinina (Sigma-Aldrich A6279) per pou. Després de 90 minuts en cultiu, el volum dels pous es va recuperar en eppendorfs de 1.5 mL que van ser centrifugats 5 min a 300xG i 4°C per pelletejar els illots. El pellet d'illots es va resuspendre en 60 µl de tampó d'homogenització de proteïnes RIPA (veure apartat 2.10.1 de Materials i Mètodes) i es van conservar congelats fins a la realització de l'assaig ELISA (veure apartat 2.11.3 de Materials i Mètodes).

2.8. Anàlisi d'expressió del mRNA per qPCR

2.8.1. Extracció de RNA total

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

Totes les mostres van ser tractades en les columnes de purificació amb DNaseI (RNase-Free DNase Set proporcionat amb les columnes, Qiagen) i, després de ser eliminada amb el *buffer* subministrat pel fabricant, van ser eluïdes amb 30 µl d'aigua destil·lada lliure de RNases (DEPC). Finalment, la concentració de RNA obtingut es va determinar mitjançant l'ús d'un Nanodrop (ND-1000, ThermoCientific).

2.8.2. Extracció de RNA dels illots pancreàtics

L'obtenció de RNA d'illots pancreàtics es realitzava mitjançant l'ús de la solució TriPure Isolation Reagent (Roche, 11667) i seguint el protocol comercial de purificació de RNA en columna de Rneasy Mini Kit de QIAGEN (Cat.No.74104, QIAGEN, Invitrogen). El mateix protocol inclou un tractament amb DNases. EL RNA quedava finalment resuspès en un volum de 30 µl d'aigua lliures de RNases.

Finalment, es determinava la concentració de RNA de les diferents mostres, tant dels teixits com dels illots pancreàtics, mesurant l'absorbància a 260nm i la puresa amb la *ratio* de les absorbàncies a 260 i 280 nm.

2.8.3. Síntesi de cDNA

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

2.8.4. PCR quantitativa

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

Gen	Seqüència Forward	Seqüència Reverse
<i>mIGF1</i>	TGGATGCTCTTCAGTTCGTGT	CAACTCATCCACAATGCCT
<i>mCdk4</i>	AGCCGAGCGTAAGATCCCCT	CAGCTGCTCCTCCATTAGGA
<i>mciclina D1</i>	CAAAATGCCAGAGGCGGATG	CATGGAGGGTGGGTGGAAA
<i>mciclina D2</i>	CTGCGGAAAAGCTGTGCATT	GAAGTCGTGAGGGGTGACTG
<i>mp21</i>	GAGGCCAGTACTTCCTCTG	AAGCCGAAGATGGGAAGA
<i>mp27</i>	AGGCGGTGCCTTTAATTGGG	TTACGTCTGGCGTCGAAGGC
<i>mMip-1α</i>	GCAACCAAGTCTTCTCAGCG	AGCAAAGGCTGCTGGTTTCA
<i>mMip-1β</i>	CCATGAAGCTCTGCGTGTCT	GAGAAACAGCAGGAAGTGGGA
<i>mMIG</i>	CGAGGCACGATCCACTACAA	AGTCCGGATCTAGGCAGGTT
<i>mIP-10</i>	CCAAGTGTGCCGTCATTTT	AGCTTCCCTATGGCCCTCAT
<i>mCCL5</i>	GTGCCACGTCAAGGAGTATT	CCCACTTCTTCTCTGGGTTGG
<i>mTNF-α</i>	TCTTCTATTCTGCTTGTGG	GGTCTGGCCATAGAAGTGA
<i>mH2-Aa</i>	CTCTGATTCTGGGGTCTCT	ACCATAGGTGCCTACGTGGT
<i>mβ2-microglobulina</i>	CCGGAGAATGGGAAGC	GTAGACGGTCTTGGGC
<i>mIFN-γ</i>	AGACAATCAGGCCATCAGCA	TGGACCTGTGGGTTGTTGAC
<i>mCD80</i>	ATACGACTCGCAACCACACC	GAATCCTGCCCCAAAGAGCA
<i>mCD86</i>	GCTTCAGTTACTGTGGCCCT	TGTCAGCGTTACTATCCCGC
<i>mCCL2</i>	ATGCAGTTAAGCCCCACTC	GCTTCTTTGGGACACCTGCT
<i>mRplp0</i>	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG
<i>rRplp0</i>	GATGCCAGGGAAGACAG	CACAATGAAGCATTTTGGGTAG

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

Reacció SYBR Green	Volum
<i>SYBR Green LightCycler® 480 Probe Master</i>	10 µl
<i>Primer forward</i> (10 µM)	0.4 µl
<i>Primer reverse</i> (10 µM)	0.4 µl
H ₂ O Milli-Q	7.2 µl
cDNA (dil.1/10)	2 µl

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

Es va utilitzar el mètode *delta-delta-Ct* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) descrit per Livak (Livak and Schmittgen, 2001) per quantificar l'expressió relativa dels gens d'interès. En aquest mètode àmpliament utilitzat, s'assumeix una duplicació òptima de cada cicle de qPCR amb una taxa d'amplificació del 100%. Amb aquest mètode, les Ct (indica el nombre de cicles al qual la quantitat del gen diana d'interès és amplificat) del gen d'interès, tant en les mostres de l'assaig com en les mostres de referència, són ajustades en relació a les Cts del gen pel qual es normalitza (*housekeeping*) per cada una de les mostres. El valor resultant servirà per determinar la diferència d'expressió.

2.9. Anàlisi d'expressió dels miRNA per qPCR

2.9.1. Extracció de miRNA dels teixits

Per a l'aïllament de miRNA els teixits es van disgregar mecànicament amb un polítró (Polytron® MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mullheim, Alemanya) amb la solució de lisi seguint les instruccions del *kit* comercial miRVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion by Life Technologies, Madrid, Espanya). Aquest *kit* es basa en una extracció orgànica del RNA seguida per una purificació amb filtres i solucions de rentat específiques proporcionades per la casa comercial.

2.9.2. Síntesi de cDNA

Els miRNA obtinguts van ser diluïts fins a una concentració de 5ng/µl dels quals 2 µl van ser retrotranscrits a cDNA utilitzant el miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR -

Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) seguint les instruccions del fabricant.

2.9.3. PCR quantitativa

A la qPCR dels miRNA, a diferència del mRNA anteriorment esmentat, es va utilitzar ExiLLENT SYBR® Green Master mix (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) seguint les instruccions de la casa comercial. Cada reacció de qPCR (ExiLLENT SYBR® Green Master mix, Exiqon) contenia 10 µl de volum total:

Reacció	ExiLLENT SYBR® Green	Volum
PCR Master mix		5 µl
Primer mix		1 µl
cDNA (dil.1/80)		4 µl

Els resultats obtinguts de les Ct van ser processats tal i com s'explica en l'apartat 2.8.4 de Materials i Mètodes, però en aquest cas es va utilitzar un gen normalitzat *housekeeping* diferent, el U6.

2.10. Extracció i anàlisi de proteïnes

2.10.1. Extracció de proteïnes d'illots pancreàtics

L'extracció de proteïnes dels illots pancreàtics es realitzava a partir d'illots aïllats (veure apartat 2.7 de Materials i Mètodes). El precipitat es resuspenia amb 60 µl del tampó d'homogeneïtzació de proteïnes RIPA (50mM TRIS-HCl pH8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5 % Na-deoxycholate, 5 mM EDTA, 0.1 % SDS, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇). Immediatament abans d'utilitzar el tampó d'homogeneïtzació RIPA s'hi afegien Ortovanadat (1000 µ) i els inhibidors de proteases (una pastilla d'inhibidors per cada 10 ml de tampó; Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics GMBH, Alemanya). Un cop resuspès el precipitat d'illots es deixava 20 minuts en gel i finalment s'homogeneïtzava mitjançant un ultrasonicador. A partir de la solució es determinava la concentració de proteïnes de l'extracte mitjançant el mètode BCA. La resta d'extracte de proteïnes es guardava a -20°C fins a la seva propera utilització.

2.10.2. Determinació de la concentració de proteïnes

Per tal de determinar la concentració de proteïnes dels diferents extractes es va utilitzar el mètode de BCA (BCA Protein Assay Reagent #23227, Thermo Scientific) seguint les instruccions de la casa comercial. Aquest mètode es basa en la reducció del Cu^{2+} en Cu^+ per la proteïna en un medi alcalí detectat per un canvi colorimètric altament sensible. Breument, es barrejaren els components del reactiu BCA en una proporció 1:50, per altra banda, es van diluir les mostres (1:5) amb H_2O -miliQ. En una placa de 96 pous transparent s'afegiren 10 μl de mostra amb 190 μl del reactiu de BCA a cada un dels pous. S'incubaren 30 minuts a 37°C i es realitzà una lectura de l'absorbància a 565nm. A partir de la comparació amb una recta patró generada amb BSA (Albúmina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) i successives dilucions es realitzaren els càlculs per obtenir la concentració de proteïna de les mostres.

2.10.3. Anàlisi de l'expressió de proteïnes mitjançant Western Blot

2.10.3.1. Electroforèsi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)

L'anàlisi de l'expressió de proteïnes es realitzà mitjançant l'electroforèsi dels diferents extractes proteics en gels de poliacrilamida al 10%, en presència de SDS (Laemmli, 1970). El gel de poliacrilamida SDS-PAGE es formà a partir de la fusió de dos gels. El primer gel és el de compactació o *stacking*, el qual contenia un 3.9% de poliacrilamida i contenia els pous a on es dipositaven les mostres. El segon, es tracta del gel separador o *resolving*, aquest contenia un 10% de poliacrilamida i s'hi donava la separació de les proteïnes. Els diferents extractes proteics es descongelaven en gel. La quantitat de proteïnes a carregar es va barrejar amb 1/5 volum de tampó de càrrega Laemmli 5x (Tampó fosfat 20mM, Glicerol 20%, SDS 4%, 2- β -mercaptoetanol 2% i blau de bromofenol com a colorant). Un cop preparades les mostres, les proteïnes es desnaturalitzaren a 90°C durant 2 minuts, es posaven en gel i es carregaren al gel SDS-PAGE. El tampó utilitzat per a l'electroforèsi fou el següent: Tris base 5mM, Glicina 192mM, SDS 0.1% (pes/vol). L'electroforèsi es va realitzar a 50V mentre les mostres creuaven el gel de compactació, i posteriorment a 80V quan es trobaven ja en el gel separador. A l'electroforèsi es va utilitzar el marcador de pes molecular per proteïnes Spectra Multicolor Broad Range (Thermo Scientific, 26623).

2.10.3.2. Transferència de proteïnes a membranes i immunodetecció

L'electrotransferència de les proteïnes des del gel a les membranes de PVDF (Hyperbond-P, Amersham Biosciences) es realitzava amb un l'aparell Transblot model 2051 de LKB/Pharmacia. A 100V durant dues hores a 4°C en un tampó

d'electrotransferència (Tris 25mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%). Després de la transferència les membranes es bloquejaven amb TBS-T (Tris-HCl 25mM, NaCl 137mM, Tween20 0.1%) amb un 5% de llet desnatada en pols i pH 7.4, o bé TBS-T amb un 5% de BSA, depenent del protocol de l'anticòs a utilitzar. El bloqueig es realitzava durant 1 hora en agitació a temperatura ambient. Posteriorment, les membranes s'incubaren amb els anticossos primaris diluïts en la mateixa solució utilitzada al bloqueig. La incubació es realitzà en agitació suau a 4°C durant tota la nit. L'endemà les membranes es rentaren amb TBS-T 0.1% (3 rentats de 5 minuts) i s'incubaren durant 1 hora, en agitació suau i a temperatura ambient, amb els corresponents anticossos secundaris, conjugats amb la peroxidasa i diluïts 1/20000 en la mateixa solució que s'havia utilitzat en el bloqueig. Finalment les membranes es rentaven de nou amb TBS-T 0.1% (3 rentats de 5 minuts). La immunodetecció es realitzava mitjançant el producte comercial ECL+ Western Blotting analysis System (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemanya) seguint el protocol del fabricant. La membrana tractada amb ECL+ s'exposava en el film fotogràfic High performance chemiluminescence film (GE Healthcare Limited, 28906835) per tal de visualitzar la senyal.

Els anticossos primaris utilitzats en aquest treball AKT-P⁴⁷³Ser, AKT total, Bad, Bcl-2 (casa) i α -Tubulina en una dilució 1/1000 estan detallats a l'apartat 1.3. de Materials i Mètodes.

Les bandes obtingudes van ser quantificades per densitometria i analitzades amb el programari ImageJ.

2.11. Determinació de paràmetres sèrics

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

2.11.1. Glucosa

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

2.11.2. Insulina

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

2.11.3. IGF-1

Els nivells circulants d'IGF1 van ser determinats mitjançant un assaig immunoenzimàtic en 10 µl de sèrum utilitzant un kit d'ELISA d'IGF-1 per a ratolí/rata comercial (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) i seguint les instruccions del fabricant. El nivell de detecció del kit és de 63 ng/ml.

2.11.4. Triglicèrids

Els nivells de triglicèrids en el sèrum van ser determinats per espectrofotometria utilitzant un *kit* comercial GPO-PAP (Horiba-ABX, Montpellier, França) i l'aparell autoanalitzador PENTRA 400 (Horiba-ABX, Montpellier, França). És un mètode basat en la reacció enzimàtica GPO-PAP descrita per Fossati et al., (Fossati and Prencipe, 1982) on el cromogen quinoneimina (PAP) es obtingut a partir de la reacció del p-clorofenol i 4-aminoantipirina catalitzada per la glicerol kinasa, el glicerol-3-fosfat oxidasa (GPO) i la peroxidasa.

2.11.5. Àcids grassos lliures

Els nivells d'àcids grassos lliures no esterificats es van determinar espectrofotomètricament utilitzant un producte comercial NEFA C (Wako Chemicals, Neuss, Alemanya) i l'autoanalitzador PENTRA 400 (ABX Diagnostics, Montpellier, França). El mètode es basa en la reacció enzimàtica de l'acil-CoA sintetasa i l'acil-Co oxidasa.

2.11.6. β-hidroxibutirat

La concentració del β-hidroxibutirat present en el sèrum va ser determinat enzimàticament (Randox Lab, Crumlin, Regne Unit) i amb l'autoanalitzador PENTRA 400 (ABX Diagnostics, Montpellier, França).

2.12. Test de tolerància a la glucosa

El test de tolerància a la glucosa es va utilitzar per comprovar si els ratolins eren capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de glucosa. Aquells animals que mantenien les glucèmies elevades i no recuperaven els nivells basals de glucosa durant el temps de realització del test eren considerats animals intolerants a la glucosa. Els animals escollits per a la realització del test es van dejunar 16 hores abans. Passades les hores de dejuni es van pesar i es va determinar la glucèmia basal a partir d'una gota de sang de la vena de la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite®. Posteriorment, se'ls va injectar intraperitonealment una dosi de 1 o 2 g de glucosa/Kg de pes. A partir d'aquest moment es van realitzar extraccions de sang seriades als 15 i 30 minuts després de la injecció de la glucosa i, posteriorment, cada 30 minuts fins a les 2 hores de l'inici del test per tal de determinar l'evolució de la glucèmia al llarg del temps. Durant aquest procés els animals no van tenir accés ni al menjar ni a l'aigua. Els resultats de les glucèmies es van expressar en mg/dl en els diferents punts de l'experiment.

El càlcul de l'àrea per sota de la corba dels perfils de glucèmia obtinguts dels test de tolerància a la glucosa es van fer amb el programari estadístic GraphPad Prism versió 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU).

2.13. Anàlisi immunohistoquímica del pàncrees

Els pàncrees dels ratolins es van fixar amb una solució tamponada de formol al 10% durant 24 hores a 4°C i a continuació es van incloure en parafina (inclusor tipus Histokinette) i es van obtenir seccions (2-3µm) amb l'ajut d'un microtom, les quals posteriorment es van desparafinar (2 rentats amb Xilol 10 minuts, 2 rentats amb etanol 100% 5 minuts i 2 rentats d'etanol 96% 5 minuts) i es va procedir a la seva tinció. Les seccions es van incubar durant tota la nit a 4°C amb els anticossos primaris corresponents: contra insulina (1/100), contra GFP (1/300), contra glucagó (1/100) i contra IGF1 (1/100). Posteriorment es van incubar amb els corresponents anticossos secundaris (1/300) i streptavidina conjugada amb fluoròfors en el cas de les immunohistoquímiques en fluorescència (1/300). Com a cromogen, en els estudis en camp clar, es va utilitzar la diaminobenzidina (DAB). Tots els anticossos utilitzats han estat descrits anteriorment en l'apartat 1.3. de Materials i Mètodes.

2.13.1. Determinació de la massa de cèl·lula β

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

2.13.2. Detecció d'apoptosi a la cèl·lula β (TUNEL).

La mesura de l'apoptosi es va realitzar mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica de TUNEL en seccions desparafinades utilitzant un marcatge terminal amb dideoxinucleòtids dUTP mitjançada per dideoxinucleotiltransferasa (TdT), kit de detecció de mort cel·lular *in situ* (Roche 1.684817). Les cèl·lules no- β es van tenyir amb un còctel d'anticossos (anti-glucagó, anti-somatostatina, i anti-polipèptid pancreàtic). Els nuclis es contrarestaven amb DAPI. Tots els anticossos utilitzats han estat descrits anteriorment en l'apartat 1.3. de Materials i Mètodes. Una cèl·lula β es considerava apoptòtica quan era positiva per TUNEL i negativa per la tinció del còctel d'anticossos no- β . La presència d'un elevat nombre de cèl·lules mononuclears al voltant dels illots no va permetre la identificació clara de la totalitat de nuclis corresponents a un illot pancreàtic. Per aquest motiu, es va fer el recompte de les cèl·lules β apoptòtiques normalitzades per número d'illots examinats.

2.13.3. Detecció de la replicació de la cèl·lula β .

La replicació de la cèl·lula β es va mesurar mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica del marcador Ki67. Aquest marcador s'expressa en nivells baixos durant la fase inicial G1 i s'acumula durant la S, G2 i M del cicle cel·lular (Starborg et al., 1996), fet que és generalment utilitzat com a marcador de la replicació.

Les mostres van ser desparafinades i tractades amb Proteinasa K (10 mg/ml) amb TRIS/HCl, pH 7.6 durant aproximadament 10 minuts a 37°C i es permeabilitzaren amb Tritón X (0.1%) amb PBS durant 2 minuts. Finalment, es va realitzar una doble tinció amb un anticòs contra insulina (1/100) i un anticòs contra Ki67 (1/200) amb la finalitat de detectar la replicació de les cèl·lules β . Es van comptabilitzar almenys 1000 nuclis de cèl·lules β dels illots per pàncrees.

2.13.4. Determinació del grau d'insulitis.

Es va analitzar la incidència i la gravetat de la insulitis en 3 seccions de parafina per pàncrees, cadascun separat entre 100 – 150 µm, i es va realitzar una immunohistoquímica contra insulina utilitzant l'anticòs esmentat anteriorment (secció 1.3 de Materials i Mètodes) i la contratinció amb hematoxilina. El grau d'insulitis (infiltració limfocitària) als illots pancreàtics es va determinar segons el criteri i classificació següent: no infiltrat (0%), periinsulitis (les cèl·lules mononuclears envolten l'illot i els ductes, però majoritàriament sense infiltració a l'arquitectura de l'illot, <25%); insulitis moderada (les cèl·lules mononucleades infiltren <50% de la superfície de l'illot); insulitis greu (> 50% de l'àrea de l'illot infiltrada per limfòcits i/o pèrdua de l'arquitectura dels illots).

2.14. Anàlisi de subpoblacions limfocitàries mitjançant citometria de flux

Per a l'anàlisi de les cèl·lules immunes mitjançant la tècnica de citometria de flux, es van obtenir extractes de cèl·lules vives de pàncrees total, dels nòduls limfàtics pancreàtics i de la melsa.

2.14.1. Aïllament de leucòcits del pàncrees

Els pàncrees van ser perfosos pel ducte pancreàtic amb 3 ml de la solució de Liberasa (descriu a l'apartat 2.7 de Materials i Mètodes) i es van mantenir en gel fins a ser incubats a 37°C durant 19 minuts per digerir el pàncrees. Després del temps d'incubació, es van afegir 10 ml de Hank's complementat amb el 5% de BSA per disgregar mecànicament i completament el pàncrees. A continuació es va centrifugar durant 2 minuts a 1200rpm i es va descartar el sobrenedant per decantació. El precipitat obtingut va ser resuspès amb un volum total de 25 ml de Hank's amb el 5% de BSA i es va deixar resposar en gel 10 minuts per tal que els trossos de teixit més gran sedimentessin. El sobrenedant va ser recol·lectat (12 ml) i filtrat a través de filtres amb un porus de 30 µm de diàmetre (PARTEC CellTrics). Seguidament, es va fer sedimentar les cèl·lules mitjançant centrifugació (1300 rpm durant 6 minuts), es va eliminar el sobrenadant i el precipitat va ser resuspès amb 4 ml de Hank's amb el 5% de BSA. A sobre d'aquests 4 ml es va afegir de forma molt acurada 4 ml de RT Histopaque 1083 (Sigma Aldrich) en un tub de 15 ml formant-se dues fases. Aquests tubs amb les dues fases van ser centrifugats a 600g durant 20 minuts amb una acceleració mínima a temperatura ambient. Com a resultat es va generar una interfase on hi havia els limfòcits pancreàtics, els quals van ser aïllats en un nou tub amb 15 ml de Hank's i 5% de BSA. Posteriorment, van ser centrifugats a 1200rpm durant 10 minuts i el sobrenedant va

ser decantat. Finalment, el precipitat va ser resuspès amb 150 µl de Hank's i 5% de BSA, preparats per ser marcats amb els anticossos.

Hank's (Quantitats per preparar 1 L)

NaCl	8 g
KCl	400 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	155 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	127 mg
KH ₂ PO ₄	60 mg

Gassejar durant 10 min
amb carbogen (95% O₂, 5% CO₂)

Afegir NaHCO₃ 380 mg

Ajustar el pH a 7.4

Nota: La solució de Hank's es preparava dies abans i es guardava filtrada (0,22µm) a 4°C.

El mateix dia en que es realitzava l'obtenció dels illots s'hi afegia 1mg/ml de BSA i 3mM de glucosa. A partir d'aquesta solució de Hank's-BSA amb glucosa es preparava la solució de col·lagenasa i les posteriors solucions de rentat i pesca dels illots.

2.14.2. Aïllament de leucòcits dels nòduls limfàtics pancreàtics

Els nòduls limfàtics del pàncrees, d'aspecte esfèric i refringent, es localitzaven entre la melsa i el duodè del ratolí amb una elevada vascularització. Un cop aïllats es van posar en una placa de 6 pous amb 1 ml de PBS amb 0.5% BSA fresc i es van deixar en gel fins a ser fragmentats en dos fines capes i cobertes amb el volum necessari de PBS amb 0.5% BSA per tal de cobrir el màxim les cèl·lules. Un cop cobertes, es va transferir la solució amb les cèl·lules en un tub de 15ml i es van rentar PBS amb 0.5% BSA fins a 1 ml. A continuació, es va centrifugar 5 minuts a 1500 rpm a 4°C i va ser decantat el sobrenedant. Les cèl·lules del precipitat resultant van ser resuspeses amb 50-100 µl de PBS amb 0.5% BSA per ser tractades per al marcatge amb els anticossos corresponents.

2.14.3. Aïllament de leucòcits de la melsa

La melsa aïllada dels animals es van posar en plaques de petri de 6 cm amb 2-3 ml de PBS amb 0.5% BSA i en gel. Un cop obtingudes totes les melses, es van fragmentar en dos talls fins cada una i cobertes amb el volum necessari de PBS amb 0.5% BSA. La solució obtinguda es va passar a través de filtres amb uns porus de 30 µm de diàmetre (PARTEC CellTrics), es va recol·lectar en un nou tub de 15 ml i es va centrifugar 5 minuts a 1200 rpm. El precipitat resultant amb les cèl·lules es va resuspendre amb 4 ml de PBS amb 0.5% BSA i a sobre de forma molt acurada i suau s'afegí 3 ml d'Histopaque 1083 (Sigma Aldrich) atemperat formant-se dues fases. A continuació es va tornar a centrifugar, però, a 600g i 20 minuts amb mínima acceleració amb l'objectiu de recol·lectar la interfase amb els limfòcits. En el nou tub amb els limfòcits aïllats de la interfase s'afegí PBS amb 0.5% BSA

fins a un volum de 15 ml i es va centrifugar a 1200 rpm durnat 10 minuts. Abans del marcatge dels limfòcits amb els anticossos, van ser resuspesos amb 700 µl de PBS amb 0.5% BSA.

2.14.4. Marcatge de la superfície cel·lular per FACS

Per al marcatge de la superfície cel·lular dels limfòcits aïllats dels diferents teixits, descrit anteriorment, amb els anticossos corresponents, es va carregar en una placa de 96 pous, 50 µl de mostra amb 10 µl totals dels diferents anticossos. En aquest treball s'han fet servir els anticossos CD4 i CD25, prèviament descrits a l'apartat 1.3 de Materials i Mètodes, diluïts amb PBS i 0.5% BSA. Es van deixar els anticossos incubant 1 hora a 4°C i a la foscor. Després de la incubació s'afegí 200 µl de PBS amb 0.5% BSA a cada pou per ser centrifugat 2 minuts a 2000 rpm i a 4°C. El precipitat visible als pous es va invertir la placa amb un cop sec per eliminar el sobrenedant i es va acabar d'eliminar les restes de gotes amb paper secant abans de tornar-la a girar, procés de rentat que es va repetir de nou. Finalment, el precipitat va ser resuspès amb 200 µl de PBS amb 0.5% BSA. En el cas de l'anticòs Foxp3 (Biolegend # 320021), marcatge intracel·lular, es va fer seguint les instruccions de la casa comercial. Les cèl·lules marcades van ser transferides als tubs especials per al citometre de flux (BD FACS Canto™). Els resultats van ser analitzats amb el programari BD FACSDiva™ Software.

2.15. Anàlisi estadística

Els resultats es van expressar com a la mitja ± error estàndard de la mitja. La comparació dels resultats es va realitzar mitjançant el test *t de Student* de dades no aparellades o a través de la taula ANOVA de dos factors. Les diferències es van considerar estadísticament significatives amb * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2007). Cellular and molecular immunology.
- Adorini, L., Gregori, S., and Harrison, L.C. (2002). Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol. Med.* 8, 31–38.
- Agudo, J., Ayuso, E., Jimenez, V., Salavert, A., Casellas, A., Tafuro, S., Haurigot, V., Ruberte, J., Segovia, J.C., Bueren, J., et al. (2008). IGF-I mediates regeneration of endocrine pancreas by increasing beta cell replication through cell cycle protein modulation in mice. *Diabetologia* 51, 1862–1872.
- Alba, A., Puertas, M.C., Carrillo, J., Planas, R., Ampudia, R., Pastor, X., Bosch, F., Pujol-Borrell, R., Verdaguer, J., and Vives-Pi, M. (2004). IFN beta accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to beta cells in nondiabetes-prone mice. *J. Immunol.* 173, 6667–6675.
- Allison, J., Campbell, I.L., Morahan, G., Mandel, T.E., Harrison, L.C., and Miller, J.F. (1988). Diabetes in transgenic mice resulting from over-expression of class I histocompatibility molecules in pancreatic beta cells. *Nature* 333, 529–533.
- Allison, J., Harrison, L.C., Campbell, I.L., and Miller, J.F. (1990). Major histocompatibility complex molecules and the beta cell: inferences from transgenic models. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 156, 121–135.
- Anderson, W.F. (1998). Human gene therapy. *Nature* 392, 25–30.
- Anderson, M.S., and Bluestone, J.A. (2005). The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 447–485.
- Anguela, X.M., Tafuro, S., Roca, C., Callejas, D., Agudo, J., Obach, M., Ribera, A., Ruzo, A., Mann, C.J., Casellas, A., et al. (2013). Nonviral-mediated hepatic expression of IGF-I increases Treg levels and suppresses autoimmune diabetes in mice. *Diabetes* 62, 551–560.
- Aoki, Y., Cioca, D.P., Oidaira, H., Kamiya, J., and Kiyosawa, K. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30, 96–102.
- Atkinson, M.A., and Eisenbarth, G.S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221–229.
- Ayuso, E., Chillón, M., Agudo, J., Haurigot, V., Bosch, A., Carretero, A., Otaegui, P.J., and Bosch, F. (2004). In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 15, 805–812.
- Ayuso, E., Chillón, M., García, F., Agudo, J., Andaluz, A., Carretero, A., Monfar, M., Moya, M., Montané, J., Otaegui, P.J., et al. (2006). In vivo gene transfer to healthy and diabetic canine pancreas. *Mol. Ther.* 13, 747–755.
- Ayuso, E., Mingozzi, F., and Bosch, F. (2010a). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr. Gene Ther.* 10, 423–436.
- Ayuso, E., Mingozzi, F., Montane, J., Leon, X., Anguela, X.M., Haurigot, V., Edmonson, S.A., Africa, L., Zhou, S., High, K.A., et al. (2010b). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther.* 17, 503–510.
- Ballian, N., and Brunnicardi, F.C. (2007). Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J. Surg.* 31, 705–714.

- Batterham, R.L., Le Roux, C.W., Cohen, M.A., Park, A.J., Ellis, S.M., Patterson, M., Frost, G.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2003). Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3989–3992.
- Beales, P.E., Castri, F., Valiant, A., Rosignoli, G., Buckley, L., and Pozzilli, P. (2002). Adrenalitis in the non-obese diabetic mouse. *Autoimmunity* 35, 329–333.
- Begg, D.P., and Woods, S.C. (2013). Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective. *Adv. Physiol. Educ.* 37, 53–60.
- Belghith, M., Bluestone, J.A., Barriot, S., Mégret, J., Bach, J.-F., and Chatenoud, L. (2003). TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat. Med.* 9, 1202–1208.
- Van Belle, T.L., Coppieters, K.T., and von Herrath, M.G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 91, 79–118.
- Bergerot, I., Fabien, N., Maguer, V., and Thivolet, C. (1995). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) protects NOD mice from insulinitis and diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 102, 335–340.
- Bergerot, I., Fabien, N., and Thivolet, C. (1996). Effects of insulin like growth factor-1 and insulin on effector T cells generating autoimmune diabetes. *Diabetes Metab.* 22, 235–239.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Bish, L.T., Morine, K., Sleeper, M.M., Sanmiguel, J., Wu, D., Gao, G., Wilson, J.M., and Sweeney, H.L. (2008). Adeno-Associated Virus (AAV) Serotype 9 Provides Global Cardiac Gene Transfer Superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the Mouse and Rat. *Hum. Gene Ther.* 19, 1359–1368.
- Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 253–257.
- Bluestone, J.A., Tang, Q., and Sedwick, C.E. (2008). T regulatory cells in autoimmune diabetes: past challenges, future prospects. *J. Clin. Immunol.* 28, 677–684.
- Böhme, J., Haskins, K., Stecha, P., van Ewijk, W., LeMeur, M., Gerlinger, P., Benoist, C., and Mathis, D. (1989). Transgenic mice with I-A on islet cells are normoglycemic but immunologically intolerant. *Science* 244, 1179–1183.
- Boitard, C., Timsit, J., Larger, E., Sempé, P., and Bach, J.F. (1993). Pathogenesis of IDDM: immune regulation and induction of immune tolerance in the NOD mouse. *Autoimmunity* 15 Suppl, 12–13.
- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y.D., Giovannoni, L., Parnaud, G., and Berney, T. (2010). Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 59, 1202–1210.
- Bottazzo, G.F., Dean, B.M., McNally, J.M., MacKay, E.H., Swift, P.G., and Gamble, D.R. (1985). In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N. Engl. J. Med.* 313, 353–360.
- Bouwens, L., and Rooman, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol. Rev.* 85, 1255–1270.

- Bradley, L.M., Asensio, V.C., Schioetz, L.K., Harbertson, J., Krahl, T., Patstone, G., Woolf, N., Campbell, I.L., and Sarvetnick, N. (1999). Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 162, 2511–2520.
- Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., and Powers, A.C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 1087–1097.
- Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J., Deghenghi, R., and Ghigo, E. (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5083–5086.
- Broglio, F., Gottero, C., Benso, A., Prodam, F., Volante, M., Destefanis, S., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J., et al. (2003). Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine* 22, 19–24.
- Budd, G.C., Pansky, B., and Glatzer, L. (1993). Preproinsulin mRNA in the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 463–469.
- Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J. Gene Med.* 10, 717–733.
- Burkly, L.C., Lo, D., and Flavell, R.A. (1990). Tolerance in transgenic mice expressing major histocompatibility molecules extrathymically on pancreatic cells. *Science* 248, 1364–1368.
- Burren, O.S., Adlem, E.C., Achuthan, P., Christensen, M., Coulson, R.M.R., and Todd, J.A. (2011). T1DBase: update 2011, organization and presentation of large-scale data sets for type 1 diabetes research. *Nucleic Acids Res.* 39, D997–1001.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.
- Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.-O., and Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2334–2339.
- Caicedo, A. (2013). Paracrine and autocrine interactions in the human islet: more than meets the eye. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 11–21.
- Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J.M. (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J. Infect. Dis.* 199, 381–390.
- Cameron, M.J., Arreaza, G.A., Grattan, M., Meagher, C., Sharif, S., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Cook, D.N., and Delovitch, T.L. (2000). Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes. *J. Immunol.* 165, 1102–1110.
- Carter, P.J., and Samulski, R.J. (2000). Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int. J. Mol. Med.* 6, 17–27.
- Casellas, A., Salavert, A., Agudo, J., Ayuso, E., Jimenez, V., Moya, M., Muñoz, S., Franckhauser, S., and Bosch, F. (2006). Expression of IGF-I in pancreatic islets prevents lymphocytic infiltration and protects mice from type 1 diabetes. *Diabetes* 55, 3246–3255.
- Castrillo, A., Bodelón, O.G., and Bosca, L. (2000). Inhibitory effect of IGF-I on type 2 nitric oxide synthase expression in Ins-1 cells and protection against activation-dependent apoptosis: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetes* 49, 209–217.

- Chandra, J., Zhivotovsky, B., Zaitsev, S., Juntti-Berggren, L., Berggren, P.O., and Orrenius, S. (2001). Role of apoptosis in pancreatic beta-cell death in diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1, S44–7.
- Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M.A., Xu, C., Mason, W.S., Moloshok, T., Bort, R., et al. (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol.* 1, 106–113.
- Chen, S., Ding, J., Bekeredjian, R., Yang, B., Shohet, R. V, Johnston, S.A., Hohmeier, H.E., Newgard, C.B., and Grayburn, P.A. (2006). Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8469–8474.
- Chen, W., Salojin, K. V, Mi, Q.-S., Grattan, M., Meagher, T.C., Zucker, P., and Delovitch, T.L. (2004). Insulin-like growth factor (IGF)-I/IGF-binding protein-3 complex: therapeutic efficacy and mechanism of protection against type 1 diabetes. *Endocrinology* 145, 627–638.
- Chen, Z., Herman, A.E., Matos, M., Mathis, D., and Benoist, C. (2005). Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 202, 1387–1397.
- Cheng, H., Wolfe, S.H., Valencia, V., Qian, K., Shen, L., Phillips, M.I., Chang, L.-J., and Zhang, Y.C. (2007). Efficient and persistent transduction of exocrine and endocrine pancreas by adeno-associated virus type 8. *J. Biomed. Sci.* 14, 585–594.
- Chuang, J.-C., Sakata, I., Kohno, D., Perello, M., Osborne-Lawrence, S., Repa, J.J., and Zigman, J.M. (2011). Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol. Endocrinol.* 25, 1600–1611.
- Churlaud, G., Jimenez, V., Ruberte, J., Amadoudji Zin, M., Fourcade, G., Gottrand, G., Casana, E., Lambrecht, B., Bellier, B., Piaggio, E., et al. (2014). Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. *Clin. Immunol.* 151, 114–126.
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jörns, A., Lenzen, S., and Eizirik, D.L. (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2, S97–107.
- Collett-Solberg, P.F., and Cohen, P. (2000). Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system. *Endocrine* 12, 121–136.
- Collombat, P., Xu, X., Ravassard, P., Sosa-Pineda, B., Dussaud, S., Billestrup, N., Madsen, O.D., Serup, P., Heimberg, H., and Mansouri, A. (2009). The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 138, 449–462.
- Cornu, M., Yang, J.-Y., Jaccard, E., Poussin, C., Widmann, C., and Thorens, B. (2009). Glucagon-like peptide-1 protects beta-cells against apoptosis by increasing the activity of an IGF-2/IGF-1 receptor autocrine loop. *Diabetes* 58, 1816–1825.
- Cornu, M., Modi, H., Kawamori, D., Kulkarni, R.N., Joffraud, M., and Thorens, B. (2010). Glucagon-like peptide-1 increases beta-cell glucose competence and proliferation by translational induction of insulin-like growth factor-1 receptor expression. *J. Biol. Chem.* 285, 10538–10545.
- Couper, J.J., Hudson, I., Werther, G.A., Warne, G.L., Court, J.M., and Harrison, L.C. (1991). Factors predicting residual beta-cell function in the first year after diagnosis of childhood type 1 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 11, 9–16.

- Cozar-Castellano, I., Fiaschi-Taesch, N., Bigatel, T.A., Takane, K.K., Garcia-Ocaña, A., Vasavada, R., and Stewart, A.F. (2006a). Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic beta-cell. *Endocr. Rev.* 27, 356–370.
- Cozar-Castellano, I., Weinstock, M., Haught, M., Velázquez-Garcia, S., Sipula, D., and Stewart, A.F. (2006b). Evaluation of beta-cell replication in mice transgenic for hepatocyte growth factor and placental lactogen: comprehensive characterization of the G1/S regulatory proteins reveals unique involvement of p21cip. *Diabetes* 55, 70–77.
- Daughaday, W.H., and Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* 10, 68–91.
- DelloRusso, C., Scott, J.M., Hartigan-O'Connor, D., Salvatori, G., Barjot, C., Robinson, A.S., Crawford, R.W., Brooks, S. V, and Chamberlain, J.S. (2002). Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12979–12984.
- Deltour, L., Leduque, P., Blume, N., Madsen, O., Dubois, P., Jami, J., and Bucchini, D. (1993). Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 527–531.
- Devedjian, J.C., George, M., Casellas, a, Pujol, a, Visa, J., Pelegrín, M., Gros, L., and Bosch, F. (2000). Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 105, 731–740.
- Deyle, D.R., and Russell, D.W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11, 442–447.
- Diabetes, D.O.F. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 36 Suppl 1, S67–74.
- Dolgin, E. (2012). Medical devices: Managed by machine. *Nature* 485, S6–8.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., and Melton, D.A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41–46.
- Driver, J.P., Serreze, D. V, and Chen, Y.-G. (2011). Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin. Immunopathol.* 33, 67–87.
- Edinger, A.L., and Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 663–669.
- Eizirik, D.L., and Mandrup-Poulsen, T. (2001). A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44, 2115–2133.
- Eizirik, D.L., Colli, M.L., and Ortis, F. (2009). The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 219–226.
- Emler, C.A., and Schalch, D.S. (1987). Nutritionally-induced changes in hepatic insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in rats. *Endocrinology* 120, 832–834.
- Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 3, 87–98.

- Fan, Y., Rudert, W.A., Grupillo, M., He, J., Sisino, G., and Trucco, M. (2009). Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *EMBO J.* 28, 2812–2824.
- Feuerer, M., Shen, Y., Littman, D.R., Benoist, C., and Mathis, D. (2009). How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity* 31, 654–664.
- Finegood, D.T., Scaglia, L., and Bonner-Weir, S. (1995). Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44, 249–256.
- Flores, R.R., Zhou, L., and Robbins, P.D. (2014). Expression of IL-2 in β cells by AAV8 gene transfer in pre-diabetic NOD mice prevents diabetes through activation of FoxP3-positive regulatory T cells. *Gene Ther.* 21, 715–722.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329–341.
- Fossati, P., and Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 28, 2077–2080.
- Foulis, A.K. (1986). Class II major histocompatibility complex and organ specific autoimmunity in man. *J. Pathol.* 150, 5–11.
- Foulis, A.K. (1987). C. L. Oakley lecture (1987). The pathogenesis of beta cell destruction in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J. Pathol.* 152, 141–148.
- Foulis, A.K., and Farquharson, M.A. (1986). Aberrant expression of HLA-DR antigens by insulin-containing beta-cells in recent-onset type I diabetes mellitus. *Diabetes* 35, 1215–1224.
- Foulis, A.K., Farquharson, M.A., and Meager, A. (1987). Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 2, 1423–1427.
- Frystyk, J., Skjaerbaek, C., Vestbo, E., Fisker, S., and Orskov, H. (1999). Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of type 2 diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 15, 314–322.
- Gaddy, D.F., Riedel, M.J., Bertera, S., Kieffer, T.J., and Robbins, P.D. (2012). dsAAV8-mediated gene transfer and β -cell expression of IL-4 and β -cell growth factors are capable of reversing early-onset diabetes in NOD mice. *Gene Ther.* 19, 791–799.
- Gao, G.-P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11854–11859.
- Garofano, A., Czernichow, P., and Bréant, B. (1997). In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 40, 1231–1234.
- Geiger, T.L., and Tauro, S. (2012). Nature and nurture in Foxp3(+) regulatory T cell development, stability, and function. *Hum. Immunol.* 73, 232–239.
- Geisler, A., Jungmann, A., Kurreck, J., Poller, W., Katus, H.A., Vetter, R., Fechner, H., and Müller, O.J. (2011). microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. *Gene Ther.* 18, 199–209.

- George, M., Ayuso, E., Casellas, A., Costa, C., Devedjian, J.C., and Bosch, F. (2002). Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 1153–1163.
- Georgia, S., and Bhushan, A. (2004). Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J. Clin. Invest.* 114, 963–968.
- Georgia, S., and Bhushan, A. (2006). p27 Regulates the transition of beta-cells from quiescence to proliferation. *Diabetes* 55, 2950–2956.
- Georgia, S., Hinault, C., Kawamori, D., Hu, J., Meyer, J., Kanji, M., Bhushan, A., and Kulkarni, R.N. (2010). Cyclin D2 is essential for the compensatory beta-cell hyperplastic response to insulin resistance in rodents. *Diabetes* 59, 987–996.
- Giannoukakis, N., Mi, Z., Rudert, W.A., Gambotto, A., Trucco, M., and Robbins, P. (2000). Prevention of beta cell dysfunction and apoptosis activation in human islets by adenoviral gene transfer of the insulin-like growth factor I. *Gene Ther.* 7, 2015–2022.
- Granata, R., Settanni, F., Biancone, L., Trovato, L., Nano, R., Bertuzzi, F., Destefanis, S., Annunziata, M., Martinetti, M., Catapano, F., et al. (2007). Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidyl inosit. *Endocrinology* 148, 512–529.
- Granata, R., Volante, M., Settanni, F., Gauna, C., Ghé, C., Annunziata, M., Deidda, B., Gesmundo, I., Aribat, T., van der Lely, A.-J., et al. (2010). Unacylated ghrelin and obestatin increase islet cell mass and prevent diabetes in streptozotocin-treated newborn rats. *J. Mol. Endocrinol.* 45, 9–17.
- Greenfield, E.A., Nguyen, K.A., and Kuchroo, V.K. (1998). CD28/B7 costimulation: a review. *Crit. Rev. Immunol.* 18, 389–418.
- Guerder, S., Meyerhoff, J., and Flavell, R. (1994). The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity* 1, 155–166.
- Hamilton-Williams, E.E., Serreze, D. V., Charlton, B., Johnson, E.A., Marron, M.P., Mullbacher, A., and Slattery, R.M. (2001). Transgenic rescue implicates beta2-microglobulin as a diabetes susceptibility gene in nonobese diabetic (NOD) mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11533–11538.
- Han, V.K., Lund, P.K., Lee, D.C., and D'Ercole, A.J. (1988). Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66, 422–429.
- Hanafusa, T., Fujino-Kurihara, H., Miyazaki, A., Yamada, K., Nakajima, H., Miyagawa, J., Kono, N., and Tarui, S. (1987). Expression of class II major histocompatibility complex antigens on pancreatic B cells in the NOD mouse. *Diabetologia* 30, 104–108.
- Harlan, D.M., Hengartner, H., Huang, M.L., Kang, Y.H., Abe, R., Moreadith, R.W., Pircher, H., Gray, G.S., Ohashi, P.S., and Freeman, G.J. (1994). Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3137–3141.
- Harrison, L.C. (2001). Risk assessment, prediction and prevention of type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* 2, 71–82.
- Harrison, M., Dunger, A.M., Berg, S., Mabley, J., John, N., Green, M.H., and Green, I.C. (1998). Growth factor protection against cytokine-induced apoptosis in neonatal rat islets of Langerhans: role of Fas. *FEBS Lett.* 435, 207–210.

- Haurigot, V., Marcó, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruzo, A., Villacampa, P., Ayuso, E., Añor, S., Andaluz, A., Pineda, M., et al. (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J. Clin. Invest.*
- Hayakawa, H., Kawarada, Y., Mizumoto, R., Hibasami, H., Tanaka, M., and Nakashima, K. (1996). Induction and involvement of endogenous IGF-I in pancreas regeneration after partial pancreatectomy in the dog. *J. Endocrinol.* 149, 259–267.
- Heath, W.R., Allison, J., Hoffmann, M.W., Schönrich, G., Hämmerling, G., Arnold, B., and Miller, J.F. (1992). Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* 359, 547–549.
- Heilbronn, R., and Weger, S. (2010). Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handb. Exp. Pharmacol.* 143–170.
- Heit, J.J., Karnik, S.K., and Kim, S.K. (2006). Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 311–338.
- Hendrick, L.M., Harewood, G.C., Patchett, S.E., and Murray, F.E. (2011). Utilization of resource leveling to optimize ERCP efficiency. *Ir. J. Med. Sci.* 180, 143–148.
- Hennige, A.M., Burks, D.J., Ozcan, U., Kulkarni, R.N., Ye, J., Park, S., Schubert, M., Fisher, T.L., Dow, M.A., Leshan, R., et al. (2003). Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J. Clin. Invest.* 112, 1521–1532.
- Hill, D.J., Petrik, J., Arany, E., McDonald, T.J., and Delovitch, T.L. (1999). Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice. *J. Endocrinol.* 161, 153–165.
- Hogg, J., Han, V.K., Clemmons, D.R., and Hill, D.J. (1993). Interactions of nutrients, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* 138, 401–412.
- Holst, L.S., Mulder, H., Manganiello, V., Sundler, F., Ahrén, B., Holm, C., and Degerman, E. (1998). Protein kinase B is expressed in pancreatic beta cells and activated upon stimulation with insulin-like growth factor I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 181–186.
- Hu, Y., Nakagawa, Y., Purushotham, K.R., and Humphreys-Beher, M.G. (1992). Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am. J. Physiol.* 263, E607–14.
- Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., Mctiernan, C.F., Kay, M.A., and Nakai, H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther.* 14, 45–53.
- Inagaki, K., Piao, C., Kotchey, N.M., Wu, X., and Nakai, H. (2008). Frequency and spectrum of genomic integration of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vector in neonatal mouse liver. *J. Virol.* 82, 9513–9524.
- Jabri, N., Schalch, D.S., Schwartz, S.L., Fischer, J.S., Kipnes, M.S., Radnik, B.J., Turman, N.J., Marcisisin, V.S., and Guler, H.P. (1994). Adverse effects of recombinant human insulin-like growth factor I in obese insulin-resistant type II diabetic patients. *Diabetes* 43, 369–374.
- Jäger, A., and Kuchroo, V.K. (2010). Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand. J. Immunol.* 72, 173–184.

- Jahansouz, C., Kumer, S.C., Ellenbogen, M., and Brayman, K.L. (2011). Evolution of β -Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus: Pancreas Transplantation. *Diabetes Technol. Ther.* 13, 395–418.
- Jansen, A., Homo-Delarche, F., Hooijkaas, H., Leenen, P.J., Dardenne, M., and Drexhage, H.A. (1994). Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 43, 667–675.
- Jayasimhan, A., Mansour, K.P., and Slattery, R.M. (2014). Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. *Clin. Sci. (Lond)*. 126, 1–18.
- Jimenez, V., Ayuso, E., Mallol, C., Agudo, J., Casellas, A., Obach, M., Muñoz, S., Salavert, A., and Bosch, F. (2011). In vivo genetic engineering of murine pancreatic beta cells mediated by single-stranded adeno-associated viral vectors of serotypes 6, 8 and 9. *Diabetologia* 54, 1075–1086.
- Jimenez, V., Muñoz, S., Casana, E., Mallol, C., Elias, I., Jambrina, C., Ribera, A., Ferre, T., Franckhauser, S., and Bosch, F. (2013). In vivo adeno-associated viral vector-mediated genetic engineering of white and brown adipose tissue in adult mice. *Diabetes* 62, 4012–4022.
- Jo, J., Choi, M.Y., and Koh, D.-S. (2007). Size distribution of mouse Langerhans islets. *Biophys. J.* 93, 2655–2666.
- Johannesson, B., Sattler, S., Semenova, E., Pastore, S., Kennedy-Lydon, T.M., Sampson, R.D., Schneider, M.D., Rosenthal, N., and Bilbao, D. (2014). Insulin-like growth factor-1 induces regulatory T cell-mediated suppression of allergic contact dermatitis in mice. *Dis. Model. Mech.* 7, 977–985.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577–1581.
- Kahn, C.R. (1985). The molecular mechanism of insulin action. *Annu. Rev. Med.* 36, 429–451.
- Kahn, S.E. (2001). Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4047–4058.
- Kaino, Y., Hirai, H., Ito, T., and Kida, K. (1996). Insulin-like growth factor I (IGF-I) delays the onset of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 34, 7–11.
- Kanagawa, O., Martin, S.M., Vaupel, B.A., Carrasco-Marin, E., and Unanue, E.R. (1998). Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: an I-Ag7-dependent reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1721–1724.
- Kang, W.J., Cho, Y.L., Chae, J.R., Lee, J.D., Ali, B.A., Al-Khedhairi, A.A., Lee, C.H., and Kim, S. (2012). Dual optical biosensors for imaging microRNA-1 during myogenesis. *Biomaterials* 33, 6430–6437.
- Kataoka, S., Satoh, J., Fujiya, H., Toyota, T., Suzuki, R., Itoh, K., and Kumagai, K. (1983). Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes* 32, 247–253.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciano, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., and Evan, G. (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385, 544–548.
- Kaufman, D.L. (2003). Murder mysteries in type 1 diabetes. *Nat. Med.* 9, 161–162.

- Kaufman, D.L., Clare-Salzler, M., Tian, J., Forsthuber, T., Ting, G.S., Robinson, P., Atkinson, M.A., Sercarz, E.E., Tobin, A.J., and Lehmann, P. V (1993). Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366, 69–72.
- Kaung, H.L. (1994). Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev. Dyn.* 200, 163–175.
- Kawasaki, E., Abiru, N., and Eguchi, K. (2004). Prevention of type 1 diabetes: from the view point of beta cell damage. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 66 Suppl 1, S27–32.
- Kay, M.A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* 12, 316–328.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C., and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7, 33–40.
- Keenan, D.B., Cartaya, R., and Mastrototaro, J.J. (2010). The pathway to the closed-loop artificial pancreas: research and commercial perspectives. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 7 Suppl 3, 445–451.
- Kelly, E.J., and Russell, S.J. (2009). MicroRNAs and the regulation of vector tropism. *Mol. Ther.* 17, 409–416.
- Knip, M., Kukko, M., Kulmala, P., Veijola, R., Simell, O., Akerblom, H.K., and Ilonen, J. (2002). Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. *Am. J. Med. Genet.* 115, 48–54.
- Konstantinova, I., and Lammert, E. (2004). Microvascular development: learning from pancreatic islets. *Bioessays* 26, 1069–1075.
- Kooijman, R. (2006). Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 305–323.
- Kooijman, R., Willems, M., De Haas, C.J., Rijkers, G.T., Schuurmans, A.L., Van Buul-Offers, S.C., Heijnen, C.J., and Zegers, B.J. (1992). Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* 131, 2244–2250.
- Kotin, R.M., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K.I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2211–2215.
- Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., Ten, S., Sanz, M., Exley, M., Wilson, B., et al. (2002). Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 131–140.
- Kulkarni, R.N. (2004). The islet beta-cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 365–371.
- Kulkarni, R.N., Holzenberger, M., Shih, D.Q., Ozcan, U., Stoffel, M., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. (2002). beta-cell-specific deletion of the *Igf1* receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat. Genet.* 31, 111–115.
- Kushner, J.A., Ciemerych, M.A., Sicinska, E., Wartschow, L.M., Teta, M., Long, S.Y., Sicinski, P., and White, M.F. (2005). Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3752–3762.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739.

- Lammert, E., Gu, G., McLaughlin, M., Brown, D., Brekken, R., Murtaugh, L.C., Gerber, H.P., Ferrara, N., and Melton, D.A. (2003). Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr. Biol.* 13, 1070–1074.
- Lenschow, D.J., Ho, S.C., Sattar, H., Rhee, L., Gray, G., Nabavi, N., Herold, K.C., and Bluestone, J.A. (1995). Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J. Exp. Med.* 181, 1145–1155.
- Leto, D., and Saltiel, A.R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 383–396.
- Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S.Y., Bhagwat, A.S., Malani, N., Anguela, X.M., Sharma, R., Ivanciu, L., et al. (2011). In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475, 217–221.
- Lingohr, M.K., Buettner, R., and Rhodes, C.J. (2002). Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol. Med.* 8, 375–384.
- Liu, J.-L. (2007). Does IGF-I stimulate pancreatic islet cell growth? *Cell Biochem. Biophys.* 48, 115–125.
- Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 6, 1258–1266.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lo, D., Burkly, L.C., Widera, G., Cowing, C., Flavell, R.A., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1988). Diabetes and tolerance in transgenic mice expressing class II MHC molecules in pancreatic beta cells. *Cell* 53, 159–168.
- Lock, M., McGorray, S., Auricchio, A., Ayuso, E., Beecham, E.J., Blouin, V., Bosch, F., Bose, M., Byrne, B., Caton, T., et al. (2010). Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Reference Standard Material. *Hum. Gene Ther.*
- Loiler, S.A., Tang, Q., Clarke, T., Campbell-Thompson, M.L., Chiodo, V., Hauswirth, W., Cruz, P., Perret-Gentil, M., Atkinson, M.A., Ramiya, V.K., et al. (2005). Localized gene expression following administration of adeno-associated viral vectors via pancreatic ducts. *Mol. Ther.* 12, 519–527.
- Lu, Y., Herrera, P.L., Guo, Y., Sun, D., Tang, Z., LeRoith, D., and Liu, J.-L. (2004). Pancreatic-specific inactivation of IGF-I gene causes enlarged pancreatic islets and significant resistance to diabetes. *Diabetes* 53, 3131–3141.
- Lund, P.K., Moats-Staats, B.M., Hynes, M.A., Simmons, J.G., Jansen, M., D'Ercole, A.J., and Van Wyk, J.J. (1986). Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J. Biol. Chem.* 261, 14539–14544.
- Ly, A., Bouchaud, C., Henin, D., Sanson, M., Delattre, J.Y., Pan, Y., Anthony, D., Duc, H.T., Evrard, P., and Trojan, J. (2000). Expression of insulin-like growth factor-I in rat glioma cells is associated with change in both immunogenicity and apoptosis. *Neurosci. Lett.* 281, 13–16.
- Lysy, P.A., Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2012). Concise review: pancreas regeneration: recent advances and perspectives. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 150–159.

- Mabley, J.G., Belin, V., John, N., and Green, I.C. (1997). Insulin-like growth factor I reverses interleukin-1beta inhibition of insulin secretion, induction of nitric oxide synthase and cytokine-mediated apoptosis in rat islets of Langerhans. *FEBS Lett.* 417, 235–238.
- Maehr, R., Chen, S., Snitow, M., Ludwig, T., Yagasaki, L., Goland, R., Leibel, R.L., and Melton, D.A. (2009). Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15768–15773.
- Maione, F., Molla, F., Meda, C., Latini, R., Zentilin, L., Giacca, M., Seano, G., Serini, G., Bussolino, F., and Giraud, E. (2009). Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J. Clin. Invest.* 119, 3356–3372.
- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., and Tochino, Y. (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* 29, 1–13.
- Manno, C.S., Pierce, G.F., Arruda, V.R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J., Rasko, J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12, 342–347.
- Many, M.C., Maniratunga, S., and Deneff, J.F. (1996). The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104 Suppl, 17–20.
- Martino, A.T., Herzog, R.W., Anegón, I., and Adjali, O. (2011). Measuring immune responses to recombinant AAV gene transfer. *Methods Mol. Biol.* 807, 259–272.
- Masat, E., Pavani, G., and Mingozzi, F. (2013). Humoral immunity to AAV vectors in gene therapy: challenges and potential solutions. *Discov. Med.* 15, 379–389.
- Mathis, D., Vence, L., and Benoist, C. (2001). beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414, 792–798.
- Mauricio, D., and Mandrup-Poulsen, T. (1998). Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes* 47, 1537–1543.
- McCaffrey, A.P., Fawcett, P., Nakai, H., McCaffrey, R.L., Ehrhardt, A., Pham, T.-T.T., Pandey, K., Xu, H., Feuss, S., Storm, T.A., et al. (2008). The host response to adenovirus, helper-dependent adenovirus, and adeno-associated virus in mouse liver. *Mol. Ther.* 16, 931–941.
- McClane, S.J., Hamilton, T.E., Burke, C. V., and Raper, S.E. (1997). Functional Consequences of Adenovirus-Mediated Murine Pancreatic Gene Transfer. *Hum. Gene Ther.* 8, 739–746.
- McEvoy, R.C., and Madson, K.L. (1980). Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. I. Morphometric quantitation. *Biol. Neonate* 38, 248–254.
- Mehran, A.E., Templeman, N.M., Brigidi, G.S., Lim, G.E., Chu, K.-Y., Hu, X., Botezelli, J.D., Asadi, A., Hoffman, B.G., Kieffer, T.J., et al. (2012). Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab.* 16, 723–737.
- Meier, J.J., Butler, A.E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2008). Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57, 1584–1594.
- Miller, D.G., Rutledge, E.A., and Russell, D.W. (2002). Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat. Genet.* 30, 147–148.

- Miller, D.G., Wang, P.-R., Petek, L.M., Hirata, R.K., Sands, M.S., and Russell, D.W. (2006). Gene targeting in vivo by adeno-associated virus vectors. *Nat. Biotechnol.* 24, 1022–1026.
- Mingozzi, F., and High, K.A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12, 341–355.
- Mingozzi, F., and High, K.A. (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 122, 23–36.
- Mingozzi, F., Meulenberg, J.J., Hui, D.J., Basner-Tschakarjan, E., Hasbrouck, N.C., Edmonson, S.A., Hutnick, N.A., Betts, M.R., Kastelein, J.J., Stroes, E.S., et al. (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 114, 2077–2086.
- Mingozzi, F., Chen, Y., Edmonson, S.C., Zhou, S., Thurlings, R.M., Tak, P.P., High, K.A., and Vervoordeldonk, M.J. (2013). Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue. *Gene Ther.* 20, 417–424.
- Montane, J., Bischoff, L., Soukhatcheva, G., Dai, D.L., Hardenberg, G., Levings, M.K., Orban, P.C., Kieffer, T.J., Tan, R., and Verchere, C.B. (2011). Prevention of murine autoimmune diabetes by CCL22-mediated Treg recruitment to the pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 121, 3024–3028.
- Morro, M., Teichenné, J., Jimenez, V., Kratzer, R.F., Marletta, S., Maggioni, L., Mallol, C., Ruberte, J., Kreppel, F., Kochanek, S., et al. (2014). Pancreatic Transduction by Helper-Dependent Adenoviral Vectors via Intraductal Delivery. *Hum. Gene Ther.*
- Moudgil, K.D., and Sercarz, E.E. (2000). The self-directed T cell repertoire: its creation and activation. *Rev. Immunogenet.* 2, 26–37.
- Mount, J.D., Herzog, R.W., Tillson, D.M., Goodman, S.A., Robinson, N., McClelland, M.L., Bellinger, D., Nichols, T.C., Arruda, V.R., Lothrop, C.D., et al. (2002). Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* 99, 2670–2676.
- Murphy, L.J., and Friesen, H.G. (1988). Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology* 122, 325–332.
- Murphy, L.J., Bell, G.I., and Friesen, H.G. (1987). Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120, 1279–1282.
- Nakae, J., Kido Y, and Accili D (2001). Distinct and Overlapping Functions of Insulin and IGF-I Receptors. *Endocr. Rev.* 22, 818–835.
- Nakai, H., Montini, E., Fuess, S., Storm, T.A., Grompe, M., and Kay, M.A. (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat. Genet.* 34, 297–302.
- Nakai, H., Fuess, S., Storm, T.A., Muramatsu, S., Nara, Y., and Kay, M.A. (2005). Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J. Virol.* 79, 214–224.
- Nielsen, J.H., Galsgaard, E.D., Møldrup, A., Friedrichsen, B.N., Billestrup, N., Hansen, J.A., Lee, Y.C., and Carlsson, C. (2001). Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes* 50 Suppl 1, S25–9.

- Norquay, L.D., D'Aquino, K.E., Opore-Addo, L.M., Kuznetsova, A., Haas, M., Bluestone, J.A., and White, M.F. (2009). Insulin receptor substrate-2 in beta-cells decreases diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology* 150, 4531–4540.
- Notkins, A.L., and Lernmark, A. (2001). Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J. Clin. Invest.* 108, 1247–1252.
- Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Hsin, H., Chikuma, S., Bour-Jordan, H., Chen, T., Pertel, T., Carnaud, C., Bluestone, J.A., and Lanier, L.L. (2003). Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 18, 41–51.
- Olsson, R., and Carlsson, P.-O. (2006). The pancreatic islet endothelial cell: emerging roles in islet function and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 710–714.
- Orci, L., and Unger, R.H. (1975). Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet* 2, 1243–1244.
- Pacak, C.A., Mah, C.S., Thattaliyath, B.D., Conlon, T.J., Lewis, M.A., Cloutier, D.E., Zolotukhin, I., Tarantal, A.F., and Byrne, B.J. (2006). Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ. Res.* 99, e3–9.
- Pagliuca, F.W., and Melton, D.A. (2013). How to make a functional β -cell. *Development* 140, 2472–2483.
- Pan, Y., Trojan, J., Guo, Y., and Anthony, D.D. (2013). Rescue of MHC-1 antigen processing machinery by down-regulation in expression of IGF-1 in human glioblastoma cells. *PLoS One* 8, e58428.
- Papaccio, G., Baccari, G.C., Strate, C., and Linn, T. (1994). Pancreatic duct inflammatory infiltration in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *J. Anat.* 185 (Pt 3, 465–470.
- Pelegrin, M., Devedjian, J.C., Costa, C., Visa, J., Solanes, G., Pujol, A., Asins, G., Valera, A., and Bosch, F. (1998). Evidence from transgenic mice that interferon-beta may be involved in the onset of diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* 273, 12332–12340.
- Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat. Rev. Cancer* 12, 159–169.
- Prado, C.L., Pugh-Bernard, A.E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B., and Sussel, L. (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2924–2929.
- Prentki, M., and Madiraju, S.R.M. (2012). Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet β -cell function in health, obesity and diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 353, 88–100.
- Printz, R.L., Magnuson, M.A., and Granner, D.K. (1993). Mammalian glucokinase. *Annu. Rev. Nutr.* 13, 463–496.
- Qader, S.S., Lundquist, I., Ekelund, M., Håkanson, R., and Salehi, A. (2005). Ghrelin activates neuronal constitutive nitric oxide synthase in pancreatic islet cells while inhibiting insulin release and stimulating glucagon release. *Regul. Pept.* 128, 51–56.
- Qader, S.S., Håkanson, R., Rehfeld, J.F., Lundquist, I., and Salehi, A. (2008). Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul. Pept.* 146, 230–237.

Qiao, C., Yuan, Z., Li, J., He, B., Zheng, H., Mayer, C., and Xiao, X. (2011). Liver-specific microRNA-122 target sequences incorporated in AAV vectors efficiently inhibits transgene expression in the liver. *Gene Ther.* 18, 403–410.

Qiu, J., and Pintel, D.J. (2004). Alternative polyadenylation of adeno-associated virus type 5 RNA within an internal intron is governed by the distance between the promoter and the intron and is inhibited by U1 small nuclear RNP binding to the intervening donor. *J. Biol. Chem.* 279, 14889–14898.

Rabinovitch, A., and Suarez-Pinzon, W.L. (2003). Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 4, 291–299.

Rabinovitch, A., Quigley, C., Russell, T., Patel, Y., and Mintz, D.H. (1982). Insulin and multiplication stimulating activity (an insulin-like growth factor) stimulate islet (beta-cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. *Diabetes* 31, 160–164.

Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* 76, 791–801.

Rahier, J., Wallon, J., and Henquin, J.C. (1981). Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia* 20, 540–546.

Randhawa, R., and Cohen, P. (2005). The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Mol. Genet. Metab.* 86, 84–90.

Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R. V, Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., and Barbacid, M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* 22, 44–52.

Raper, S.E., and DeMatteo, R.P. (1996). Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat pancreas. *Pancreas* 12, 401–410.

Rehman, K.K., Trucco, M., Wang, Z., Xiao, X., and Robbins, P.D. (2008). AAV8-mediated gene transfer of interleukin-4 to endogenous beta-cells prevents the onset of diabetes in NOD mice. *Mol. Ther.* 16, 1409–1416.

Rhodes, C.J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307, 380–384.

Rhodes, C.J., and White, M.F. (2002). Molecular insights into insulin action and secretion. *Eur. J. Clin. Invest.* 32 Suppl 3, 3–13.

Riedel, M.J., Gaddy, D.F., Asadi, A., Robbins, P.D., and Kieffer, T.J. (2010). DsAAV8-mediated expression of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Gene Ther.* 17, 171–180.

Roep, B.O., and Tree, T.I.M. (2014). Immune modulation in humans: implications for type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 229–242.

Le Roith, D. (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N. Engl. J. Med.* 336, 633–640.

Rosenfeld, R.G. (2006). Molecular mechanisms of IGF-I deficiency. *Horm. Res.* 65 Suppl 1, 15–20.

Rosmalen, J.G.M., Leenen, P.J.M., Pelegri, C., Drexhage, H.A., and Homo-Delarche, F. (2002). Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 209–214.

- Rossini, A.A., Appel, M.C., Williams, R.M., and Like, A.A. (1977). Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes* 26, 916–920.
- Rotwein, P., Pollock, K.M., Watson, M., and Milbrandt, J.D. (1987). Insulin-like growth factor gene expression during rat embryonic development. *Endocrinology* 121, 2141–2144.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 490–500.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431–440.
- Samulski, R.J., Berns, K.I., Tan, M., and Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2077–2081.
- Samulski, R.J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J.D., Housman, D.E., Epstein, N., and Hunter, L.A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 10, 3941–3950.
- Saravia, F., and Homo-Delarche, F. (2003). Is innervation an early target in autoimmune diabetes? *Trends Immunol.* 24, 574–579.
- Sarvetnick, N., Liggitt, D., Pitts, S.L., Hansen, S.E., and Stewart, T.A. (1988). Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell* 52, 773–782.
- Sarvetnick, N., Shizuru, J., Liggitt, D., Martin, L., McIntyre, B., Gregory, A., Parslow, T., and Stewart, T. (1990). Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature* 346, 844–847.
- Savage, M.O., Camacho-Hübner, C., and Dunger, D.B. (2004). Therapeutic applications of the insulin-like growth factors. *Growth Horm. IGF Res.* 14, 301–308.
- Scallan, C.D., Jiang, H., Liu, T., Patarroyo-White, S., Sommer, J.M., Zhou, S., Couto, L.B., and Pierce, G.F. (2006). Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* 107, 1810–1817.
- Schmid, R.M., Weidenbach, H., Yamagushi, H., Lührs, H., Liptay, S., and Adler, G. (1998). Direct gene transfer into the rat pancreas using DNA-liposomes. *Eur. J. Clin. Invest.* 28, 220–226.
- Schnedl, W.J., Ferber, S., Johnson, J.H., and Newgard, C.B. (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43, 1326–1333.
- Van Schravendijk, C.F., Foriers, A., Van den Brande, J.L., and Pipeleers, D.G. (1987). Evidence for the presence of type I insulin-like growth factor receptors on rat pancreatic A and B cells. *Endocrinology* 121, 1784–1788.
- Serreze, D. V., Gaedeke, J.W., and Leiter, E.H. (1993). Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9625–9629.
- Sherry, N., Hagopian, W., Ludvigsson, J., Jain, S.M., Wahlen, J., Ferry, R.J., Bode, B., Aronoff, S., Holland, C., Carlin, D., et al. (2011). Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protégé study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 378, 487–497.

- Shih, D.Q., Heimesaat, M., Kuwajima, S., Stein, R., Wright, C.V.E., and Stoffel, M. (2002). Profound defects in pancreatic beta-cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, Hnf-1alpha, and Hnf-3beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3818–3823.
- Shih, H.P., Wang, A., and Sander, M. (2013). Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 81–105.
- Shingara, J., Keiger, K., Shelton, J., Laosinchai-Wolf, W., Powers, P., Conrad, R., Brown, D., and Labourier, E. (2005). An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA* 11, 1461–1470.
- Simmons, R.A., Templeton, L.J., and Gertz, S.J. (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 50, 2279–2286.
- Slattery, R.M., Miller, J.F., Heath, W.R., and Charlton, B. (1993). Failure of a protective major histocompatibility complex class II molecule to delete autoreactive T cells in autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10808–10810.
- Smith, F.E., Rosen, K.M., Villa-Komaroff, L., Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (1991). Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6152–6156.
- Somoza, N., Vargas, F., Roura-Mir, C., Vives-Pi, M., Fernández-Figueras, M.T., Ariza, A., Gomis, R., Bragado, R., Martí, M., Jaraquemada, D., et al. (1994). Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. *J. Immunol.* 153, 1360–1377.
- Soria, B., Roche, E., Berná, G., León-Quinto, T., Reig, J.A., and Martín, F. (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49, 157–162.
- Srivastava, A., Lusby, E.W., and Berns, K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* 45, 555–564.
- Starborg, M., Gell, K., Brundell, E., and Höög, C. (1996). The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 1, 143–153.
- Stefan, Y., Grasso, S., Perrelet, A., and Orci, L. (1982). The pancreatic polypeptide-rich lobe of the human pancreas: definitive identification of its derivation from the ventral pancreatic primordium. *Diabetologia* 23, 141–142.
- Stilwell, J.L., and Samulski, R.J. (2004). Role of viral vectors and virion shells in cellular gene expression. *Mol. Ther.* 9, 337–346.
- Stuart, C.A., Meehan, R.T., Neale, L.S., Cintron, N.M., and Furlanetto, R.W. (1991). Insulin-like growth factor-I binds selectively to human peripheral blood monocytes and B-lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72, 1117–1122.
- Sunami, E., Kanazawa, H., Hashizume, H., Takeda, M., Hatakeyama, K., and Ushiki, T. (2001). Morphological characteristics of Schwann cells in the islets of Langerhans of the murine pancreas. *Arch. Histol. Cytol.* 64, 191–201.
- Taniguchi, H., Yamato, E., Tashiro, F., Ikegami, H., Ogihara, T., and Miyazaki, J. (2003). beta-cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas. *Gene Ther.* 10, 15–23.

- Tapson, V.F., Boni-Schnetzler, M., Pilch, P.F., Center, D.M., and Berman, J.S. (1988). Structural and functional characterization of the human T lymphocyte receptor for insulin-like growth factor I in vitro. *J. Clin. Invest.* 82, 950–957.
- Teta, M., Long, S.Y., Wartschow, L.M., Rankin, M.M., and Kushner, J.A. (2005). Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54, 2557–2567.
- Teta, M., Rankin, M.M., Long, S.Y., Stein, G.M., and Kushner, J.A. (2007). Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev. Cell* 12, 817–826.
- Thatava, T., Kudva, Y.C., Edukulla, R., Squillace, K., De Lamo, J.G., Khan, Y.K., Sakuma, T., Ohmine, S., Terzic, A., and Ikeda, Y. (2013). Inpatient variations in type 1 diabetes-specific iPS cell differentiation into insulin-producing cells. *Mol. Ther.* 21, 228–239.
- Tisch, R., and McDevitt, H. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85, 291–297.
- Todd, J.A., and Wicker, L.S. (2001). Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity* 15, 387–395.
- Todd, J.A., Bell, J.I., and McDevitt, H.O. (1987). HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329, 599–604.
- Tong, J., Prigeon, R.L., Davis, H.W., Bidlingmaier, M., Kahn, S.E., Cummings, D.E., Tschöp, M.H., and D'Alessio, D. (2010). Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* 59, 2145–2151.
- Torres Aleman, I. (2005). Role of insulin-like growth factors in neuronal plasticity and neuroprotection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 567, 243–258.
- Trojan, J., Duc, H.T., Upegui-Gonzalez, L.C., Hor, F., Guo, Y., Anthony, D., and Ilan, J. (1996). Presence of MHC-I and B-7 molecules in rat and human glioma cells expressing antisense IGF-I mRNA. *Neurosci. Lett.* 212, 9–12.
- Tsutsui, T., Hesabi, B., Moons, D.S., Pandolfi, P.P., Hansel, K.S., Koff, A., and Kiyokawa, H. (1999). Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7011–7019.
- Turley, S., Poirot, L., Hattori, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2003). Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J. Exp. Med.* 198, 1527–1537.
- Uchida, T., Nakamura, T., Hashimoto, N., Matsuda, T., Kotani, K., Sakaue, H., Kido, Y., Hayashi, Y., Nakayama, K.I., White, M.F., et al. (2005). Deletion of *Cdkn1b* ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nat. Med.* 11, 175–182.
- Ueki, K., Okada, T., Hu, J., Liew, C.W., Assmann, A., Dahlgren, G.M., Peters, J.L., Shackman, J.G., Zhang, M., Artner, I., et al. (2006). Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta cells causes overt diabetes. *Nat. Genet.* 38, 583–588.
- Upegui-Gonzalez, L.C., Duc, H.T., Buisson, Y., Arborio, M., Lafarge-Frayssinet, C., Jasmin, C., Guo, Y., and Trojan, J. (1998). Use of the IGF-I antisense strategy in the treatment of the hepatocarcinoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 451, 35–42.
- Varey, A.M., Hutchings, P., O'Reilly, L., Hussell, T., Waldmann, H., Simpson, E., and Cooke, A. (1991). The development of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice: the role of CD4+ and CD8+ T cells. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 187–191.

- Vasaturo, A., Di Blasio, S., Peeters, D.G.A., de Koning, C.C.H., de Vries, J.M., Figdor, C.G., and Hato, S. V (2013). Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go. *Front. Immunol.* 4, 417.
- Vasavada, R.C., Gonzalez-Pertusa, J.A., Fujinaka, Y., Fiaschi-Taesch, N., Cozar-Castellano, I., and Garcia-Ocaña, A. (2006). Growth factors and beta cell replication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 931–950.
- Verma, I.M., and Weitzman, M.D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 711–738.
- Vincent, A.M., and Feldman, E.L. (2002). Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm. IGF Res.* 12, 193–197.
- Waldron-Lynch, F., and Herold, K.C. (2011). Immunomodulatory therapy to preserve pancreatic β -cell function in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 439–452.
- Wang, A.Y., Peng, P.D., Ehrhardt, A., Storm, T.A., and Kay, M.A. (2004). Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum. Gene Ther.* 15, 405–413.
- Wang, Z., Ma, H.-I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., and Xiao, X. (2003). Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 10, 2105–2111.
- Wentworth, B.M., Schaefer, I.M., Villa-Komaroff, L., and Chirgwin, J.M. (1986). Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J. Mol. Evol.* 23, 305–312.
- De Wet, J.R., Wood, K. V, DeLuca, M., Helinski, D.R., and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 725–737.
- White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E413–22.
- Wicker, L.S., Todd, J.A., and Peterson, L.B. (1995). Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 179–200.
- Wilson, G.L., Patton, N.J., McCord, J.M., Mullins, D.W., and Mossman, B.T. (1984). Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia* 27, 587–591.
- Wilson, M.E., Scheel, D., and German, M.S. (2003). Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech. Dev.* 120, 65–80.
- Winer, S., Tsui, H., Lau, A., Song, A., Li, X., Cheung, R.K., Sampson, A., Afifiyan, F., Elford, A., Jackowski, G., et al. (2003). Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat. Med.* 9, 198–205.
- Withers, D.J. (2000). Perspective: The Insulin Signaling System--A Common Link in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocrinology* 141, 1917–1921.
- Withers, D.J., Burks, D.J., Towery, H.H., Altamuro, S.L., Flint, C.L., and White, M.F. (1999). Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat. Genet.* 23, 32–40.
- Xu, X., D'Hoker, J., Stangé, G., Bonn e, S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Casteele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D., et al. (2008). Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132, 197–207.

- Yada, T., Dezaki, K., Sone, H., Koizumi, M., Damdindorj, B., Nakata, M., and Kakei, M. (2008). Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr. Diabetes Rev.* 4, 18–23.
- Ylä-Herttua, S. (2012). Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol. Ther.* 20, 1831–1832.
- Yoon, J.-W., and Jun, H.-S. (2005). Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am. J. Ther.* 12, 580–591.
- Zapf, J., Schoenle, E., and Froesch, E.R. (1978). Insulin-like growth factors I and II: some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum. *Eur. J. Biochem.* 87, 285–296.
- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., Shi, Y., and Deng, H. (2009). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res.* 19, 429–438.
- Zhang, G., Budker, V., and Wolff, J.A. (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* 10, 1735–1737.
- Zhang, L., Chen, Y., Li, C., Lin, X., Cheng, X., and Li, T. (2014). Protective effects of combined intervention with adenovirus vector mediated IL-10 and IGF-1 genes on endogenous islet β cells in nonobese diabetes mice with onset of type 1 diabetes mellitus. *PLoS One* 9, e92616.
- Zhou, Z., and Jensen, P.E. (2013). Structural Characteristics of HLA-DQ that May Impact DM Editing and Susceptibility to Type-1 Diabetes. *Front. Immunol.* 4, 262.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16, 1073–1080.
- Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J., and Muzyczka, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* 6, 973–985.