



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE VETERINARIA

CENTRO DE BIOTEGNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA

**TERAPIA GÉNICA PARA LA DIABETES TIPO I
BASADA EN LA ADMINISTRACIÓN
INTRAMUSCULAR DE
AAV1 INSULINA-GLUCOQUINASA**

MARÍA LUISA JAÉN SITGES

Este trabajo experimental ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert y el Dr. Miquel García Martínez en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y en el Centre de Biotecnología Animal y Terapia Génica.

MARÍA LUISA JAÉN SITGES

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

MIQUEL GARCÍA MARTÍNEZ

SETIEMBRE 2017

BELLATERRA

A mis padres, por su apoyo incondicional. Y a ti, Albert, porque a tu lado todo es posible.

Sembla mentida que han passat ja quatre anys i hem toca dipositar tesis i agrair-vos a tots vosaltres tota la ajuda que m'heu donat, son moltes persones les que han fet possible la realització d'aquesta tesi doctoral.

En primer lloc, voldria agrair a la meva directora de tesi, la Dra. Fàtima Bosch per haver-me donat l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral al seu grup d'investigació, per la seva dedicació i esforços destinats a aquest projecte.

Agrair també al meu co-director de tesis Miquel Garcia, per sempre buscar temps per resoldre els meus dubtes, per ajudar-me quan ho he necessitat i per guiar-me i ajudar-me en la redacció d'aquest treball.

Hem sento privilegiada d'haver tingut la ajuda i poder haver treballat amb uns post doc tan bons, amb els que he après molt. Moltes gràcies a Laia per treballar amb mi aquests anys, per ajudar-me amb tot al laboratori i per ensenyar-me tantes coses. També per compartir amb mi els bons moments i sobretot per recolzar-me i preocupar-te per mi en els moments més difícils. Agradecer también la ayuda de Vero todos estos años, por tener siempre un momento para resolver mis dudas, por darle la vuelta a las cosas y buscar soluciones, siempre te estaré agradecida. Agradecer a Vicky su ayuda y apoyo. També vull agrair a Ivet la seva ajuda en aquest llarg camí.

Agrair especialment a Jordi la seva ajuda amb els gossos, sempre ha estat disponible quan el necessitava, gracias per fer les estones de GTT més agradables y per recolzar-me i animar-me en els moments més durs, tot hi que t'ha sortit una competidora. Gracias Sara por ser mi mano derecha durante estos dos últimos años, mi amiga, por ayudarme en todo, por revisar mi tesis en busca de errores y faltas ortográficas. Junto a Jeni habéis llenado de alegría nuestra zona de trabajo. Gracias a Jeni por sus largas charlas, por ser mi profesora de estiramientos, que tanto han ayudado a mi salud. Gracias a Estefanía, Víctor Sánchez, Víctor Sacristán, Joan, Xavi Sánchez por hacer que el laboratorio tanga tan buen ambiente, por traer risas y alegría, y por preocuparos cuando las cosas no van tan bien.

Gràcies Claudia, tot i estar escrivint com jo, sempre has tingut un moment per preguntar-me com anava i per animar-me. Gràcies a Carles, Albert, Sara, Sandra, Cris i Meritxell per la seva ajuda, sobretot al principi que anava una mica perduda al laboratori, gracias per ser tan bons companys. Gràcies a Alba per la seva ajuda i comprensió, per organitzar els journals i sempre ajudar-me a triar el millor article i revisar les presentacions. Agrair a Tura

la teva ajuda a l'estabulari i pels RIAs d'insulina, i per sempre està disponible a resoldre dubtes. Gràcies als nou vinguts Gemma i Ignasi per ser tan agradables i aportar més bon ambient al laboratori.

Agradecer también a mi comisión de seguimiento, Sylvie, Sergio y Pedro, por darme buenos consejos y seguir de cerca mi evolución durante estos años.

Moltes gràcies Maria Molas per ensenyar-me tot sobre la biologia molecular, però sobretot per estar per mi, per cuidar-me i preocupar-te per mi.

Agrair especialment a Xavi León per produir els vectors virals, per estar sempre estudiant com millorar les produccions y sobretot per sempre treure'm un somriure i ser tan bon company.

Gracias a Jenny, Lúdia y Mireia por su alegría y por tener todo disponible para facilitar nuestro trabajo, por resolver mis dudas y ayudarme siempre. Muchas gracias a Marta por sus impecables tinciones y por su ayuda. Gràcies a Montse, Rosmi i Jessica per ajudar-nos amb les gestions i fer més fàcil tota la paperassa. Gràcies també a tot l'equip del SER-CBATEG per cuidar dels animals.

Donar les gràcies a Ana Pujol, Ana Arbós i Sandra Turón, per ser tant maques i agradables, es un plaer coincidir i esmorzar plegades.

Agradecer también a Jesús Ruberte su ayuda en la toma de muestras de este proyecto, por resolver dudas anatómicas y por su apoyo. Agradecer también a todo su grupo el ser tan agradables y simpáticos.

Agrair al personal de l'HCV la seva ajuda en aquest projecte, en especial a Anna Andaluz i al seu pupil Adri, a Rafael Ruiz de Gopegui i Félix Garcia que han estat des de sempre involucrats en aquest projecte. També agrair a les ATV de l'HCV Maribel, Raquel, Erica, Marta, Juan y Albert cuidar tan bé dels nostres gossos i ajudar-me incondicionalment. Agrair també a Dídac el seu bon tracte i la seva manera de fer quan han sorgit problemes. Agrair a les noies del SBCV Yolanda i a les dues Raquels, la seva ajuda, atenció i simpatia.

Agrair al Servei de Granges experimentals de la UAB per cuidar dels nostres animals i per ajudar-me quan ho he necessitat. Agrair especialment a tots els estudiants Cris, Mateu, Daniel, Josep, Carla, Stef i Raquel que ens han ajudat a cuidar als gossos, fent que la seva estància fos la millor possible.

Agrair també a les persones que ja no estan al Cbateg però que van ser les que em van convèncer de començar aquest projecte, gràcies a Edu, David i Iris, per ensenyar-me tot sobre el projecte, i tot i estar molt lluny d'aquí sempre tenir temps per contestar els meus emails. Gracias también a Luca Maggioni por su ayuda durante estos años y por su simpatía.

Moltíssimes gracies als petits herois que ja no estan amb nosaltres però que son la peça més important, sense vosaltres mai hauríem arribat fins aquí.

Agrair també els meus amics David, Yoli, Ana, Vero i Meritxell per portar tants anys al meu costat, per aportar-me tant bons moments i per estar quan us necessito. També a les meves companyes de Veterinària Ari i Elena per seguir de prop la meva evolució i per sempre preocupar-vos per mi. Thank you very much Eithne, for being such a good friend and always cheer me up.

Agradecer por supuesto a mi familia, sobre todo a mis padres por su apoyo incondicional, por creer siempre en mí, hasta cuando los resultados no eran buenos, sin vuestra ayuda no habría conseguido llegar hasta aquí. Muchas gracias a mi hermana Inés, confidente y amiga, por compartir tantos momentos buenos conmigo y por hacerme sentir parte de su familia, que tantas alegrías me dan. Agradecer también a mis sobrinos Eneas, Gara y Hector por darme tantos buenos momentos, por contagiarme vuestra ilusión. Muchas gracias a la familia de Albert por hacerme sentir una más y compartir tantos momentos conmigo. Dar las gracias también a mis abuelos y a mi primo Antonio, que desgraciadamente no están aquí pero que sé que estarían muy orgullosos de mí.

Por último, agradecerte a ti, Albert, mi compañero durante estos últimos 10 años, por estar siempre a mi lado, por cuidarme, por creer en mi más que yo misma, sin tu apoyo no habría podido llegar hasta aquí. ... *amor meu sempre hi seré...*

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad y el Fondo Europeo para el desarrollo Regional (FEDER) (Plan Nacional I+D+I (SAF2011-24698 y SAF2014-54866-R), de la Generalitat de Catalunya (2014SGR-1669 e ICREA *Academia*), España y de la Comisión Europea (MYOCURE PHC-14-2015-667751).

AAP	Proteína de activación de ensamblaje
AAV	Vector adenoasociado
AAVs	Vectores adenoasociados
AAV1	Vector adenoasociado serotipo 1
AAV2	Vector adenoasociado serotipo 2
ABC	Área bajo la curva
AGEs	<i>Advanced glycation end products</i>
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BB	Rata bioBreeding
BSA	Albumina de suero bovino
bGH	Señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento
CEEAH	<i>Comité d'Ètica en l'Experimentació animal i humana de la UAB</i>
CBATEG	<i>Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica</i>
CMV	Promotor del citomegalovirus humano
CS	Control sano
CSII	Sistema de infusión de insulina subcutáneo
CT	Control
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleósidos trifosfatos
dsAAV	Vectores adenoasociados con genoma de doble cadena
DSPN	Polineuropatía sensitiva o sensoriomotora
EEM	Error estándar de la media
ESC	Células madre embrionarias
ESRD	Enfermedad renal en etapa terminal
FBS	Suero fetal bovino
GAD65	Ácido glutámico descarboxilasa 65
GCK	Glucoquinasa
GLUT1	Proteína transportadora de glucosa 1
GLUT2	Proteína transportadora de glucosa 2
GLUT4	Proteína transportadora de glucosa 4
GLUT5	Proteína transportadora de glucosa 5

GLUT7	Proteína transportadora de glucosa 7
GM2-1	Gangliósido
GT3	Trisialota-gangliósido
GTT	Test de tolerancia a la glucosa
HEK293	Células embrionarias de riñón humano 293
HKI	Hexoquinasa I
HKII	Hexoquinasa II
HLA	<i>Human leukocyte antigens</i>
HNF-1α	Factor nuclear de hepatocitos 1 α
HNF-1β	Factor nuclear de hepatocitos 1 β
HNF-4α	Factor nuclear de hepatocitos 4 α
H&E	Hematoxilina-eosina
IAAs	Autoanticuerpos contra la insulina
I-A2	Antígeno asociado a insulinoma 2
IA2β	Antígeno asociado a insulinoma 2 β
ICA512	Antígeno asociado a insulinoma 2
ICA69	Autoantígeno de células de islote
IFN-α	Interferón α
iGTT	Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal
Ins	Insulina
IPF-1	Factor promotor de insulina
iPS	Células pluripotenciales inducidas
ITRs	Repeticiones terminales invertidas
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis-Menten
LDL	Proteínas de baja densidad
miniCMV	Promotor del minimal citomegalovirus humano
MLC	<i>Myosin light chain promotor</i>
MODY	<i>Madurity Onset Diabetes of the Young</i>
mRNA	RNA mensajero
NOD	Ratón diabético no obeso
OGTT	Test de tolerancia a la glucosa oral
ORF	Marco de lectura abierta

PAS	Tinción de ácido peryodico schiff
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PNDM	Diabetes neonatal permanente
rAAV	Vector adenoasociado recombinante
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
RIA	Radioinmunoensayo
RB	<i>Roller bottle</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RSV	Promotor del virus del sarcoma de Rous
RT-PCR	<i>Real Time PCR</i>
SBCV	Servei de Bioquímica Clínica Veterinària de la Facultat de Veterinària
ssDNA	DNA de cadena simple
STZ	Estreptozotocina
SV40	Señal de poliadenilación del <i>simian virus 40</i>
Th1	Linfocitos T colaboradores de tipo 1
TNDM	Diabetes neonatal permanente
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	<i>Apoptosis inducing ligand</i>
Tregs	Linfocitos T reguladores
u.a	Unidades arbitrarias
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
UV	Ultravioleta
V	Voltios
Vg	Genomas virales
VSMC	Músculo liso vascular

I. PRESENTACIÓN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
1. CONTROL DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.....	3
1.1. Papel del músculo esquelético en la homeostasis de la glucosa.....	4
2. MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	6
2.1. Estructura del músculo esquelético.....	6
2.2. Tipos de fibras musculares.....	7
3. DIABETES MELLITUS.....	9
3.1 Diabetes tipo 1.....	11
3.2. Patogenia de la diabetes tipo 1.....	12
3.3. Etiología genética de la diabetes tipo 1.....	14
3.4. Factores ambientales en la diabetes tipo 1.....	15
3.5. Complicaciones a largo plazo asociadas a la diabetes tipo 1.....	16
3.5.1. <i>Complicaciones microvasculares en la diabetes tipo 1.....</i>	<i>17</i>
3.5.2. <i>Complicaciones macrovasculares en la diabetes tipo 1.....</i>	<i>19</i>
4. TRATAMIENTOS DE LA DIABETES TIPO 1.....	20
4.1. Administración de insulina exógena.....	20
4.2. Terapia con bomba de insulina.....	22
4.3. Trasplante de páncreas.....	23
4.4. Trasplante de islotes.....	24
4.5. Terapia celular.....	24
5. TERAPIA GÉNICA MEDIANTE VECTORES ADENOASOCIADOS.....	25
5.1. Biología de los virus adenoasociados.....	27
5.2. Vectores AAV recombinantes.....	28

6. TERAPIA GÉNICA MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE VECTORES AAV-INS Y AAV-GCK.....	32
6.1. Antecedentes: producción de insulina mediante la modificación genética del músculo esquelético.....	33
6.2. Antecedentes: Expresión de glucoquinasa en músculo esquelético.....	34
6.3. Reversión de la diabetes tipo 1 mediante un sensor de glucosa en el músculo esquelético.....	36
6.4. Reversión de la diabetes tipo 1 en perro mediante un sensor de la glucosa en el músculo esquelético.....	38
III. OBJETIVOS.....	39
IV. RESULTATS.....	40
PARTE-I. Eficacia y seguridad a largo plazo de la terapia génica para diabetes tipo 1 con insulina y glucoquinasa.....	40
1. CONTROL GLUCÉMICO EN PERROS TRATADOS CON AAV1-INS + AAV1-GCK	40
2. CORRECCIÓN METABÓLICA DE LA DIABETES MEDIANTE TERAPIA GÉNICA MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON AAV1-INS + AAV1-GCK.....	43
3. BIODISTRIBUCIÓN DEL VECTOR Y PERSISTENCIA DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES TERAPÉUTICOS.....	47
PARTE-II. Generación de un vector adeno-asociado de serotipo 1 (AAV1)dual para la expresión de insulina y glucoquinasa.....	50
1. GENERACIÓN DE UN VECTOR DUAL PARA LA EXPRESIÓN CONJUNTA DE INSULINA Y GLUCOQUINASA.....	50
1.1. Diseño y generación del constructo dual CMV-Insulina-RSV-Glucoquinasa.....	51
1.2. Generación de nuevos constructos AAV duales optimizados con CMV-Insulina-RSV-Glucoquinasa.....	53
1.3. Constructos AAV duales optimizados miniCMV-Insulina-RSV-Glucoquinasa.....	56
2. COMPARACIÓN DEL VECTOR DUAL “L” RESPECTO A LOS VECTORES INDIVIDUALES...59	

2.1. Evaluación de la tolerancia a la glucosa en ratones sanos tratados con el vector AAV "L"	59
2.2. Evaluación de la expresión del transgén de la insulina y el de la glucoquinasa <i>in vivo</i> en ratones sanos.....	61
2.3. Evaluación de la eficacia <i>in vivo</i> del vector AAV "L" en ratones diabéticos.....	62
V. DISCUSIÓN.....	65
VI. CONCLUSIONES.....	71
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
1. MATERIALES.....	73
1.1. Animales.....	73
1.1.1. Ratones.....	73
1.1.2. Perros.....	73
1.2. Cepas bacterianas.....	74
1.3. Oligonucleótidos y sondas.....	74
1.4. Plásmidos.....	75
1.5. Reactivos.....	76
2. MÉTODOS.....	77
2.1. Técnicas básicas de DNA.....	77
2.1.1. Preparación del DNA plasmídico.....	76
2.1.2. Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	77
2.1.3. Defosforilación de fragmentos de DNA.....	78
2.1.4. Generación de extremos romos de fragmentos de DNA.....	78
2.1.5. Ligación: construcción de moléculas híbridas.....	78
2.1.6. Transformación en células competentes <i>E.coli</i> XL2-Blue.....	79
2.1.7. Separación y visualización de fragmentos de DNA.....	79
2.2. Células eucariotas en cultivo.....	80
2.2.1. Células HEK293.....	80

2.2.2. <i>Transfección de DNA en células en cultivo</i>	80
2.3. Producción, purificación y titulación de los vectores virales adenoasociados.....	80
2.3.1. <i>Producción y purificación</i>	80
2.3.2. <i>Titulación de genomas virales</i>	82
2.3.3. <i>Cuantificación de las partículas virales por tinción de plata</i>	83
2.4. Administración intramuscular de los vectores virales AAV.....	83
2.4.1. <i>Administración intramuscular de AAV en ratones</i>	83
2.4.2. <i>Administración intramuscular de AAV en perros</i>	84
2.5. Inducción experimental de diabetes tipo 1.....	85
2.5.1. <i>Inducción experimental de diabetes en ratones</i>	85
2.5.2. <i>Inducción experimental de diabetes en perros</i>	85
2.6. Biodistribución de los vectores AAV.....	86
2.7. Expresión del transgén.....	87
2.8. Morfología y Análisis Immunohistoquímico.....	87
2.9. Determinación de parámetros séricos.....	87
2.9.1. <i>Insulina y péptido C</i>	88
2.9.2. <i>Determinación de la glucosa en sangre</i>	88
2.9.3. <i>Determinación de fructosamina, triglicéridos y colesterol</i>	88
2.10. Determinación de actividad glucoquinasa.....	88
2.11. Test de tolerancia a la glucosa.....	89
2.11.1. <i>Test de tolerancia a la glucosa en ratones</i>	89
2.11.2. <i>Test de tolerancia a la glucosa en perros</i>	89
2.12. Análisis estadístico.....	90
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	91

I. PRESENTACIÓN

Los pacientes con diabetes tipo 1 necesitan terapia sustitutiva con insulina exógena para sobrevivir. No obstante, el control estricto de la glucemia requiere el uso de altas dosis de la hormona, lo que aumenta el riesgo de episodios hipoglucémicos. Además, la regulación subóptima de los niveles de glucosa comporta hiperglucemia crónica, la cual causa el desarrollo de complicaciones secundarias severas. Por lo tanto, la regulación eficiente de la homeostasis de la glucosa es un reto importante en cualquier tratamiento para la diabetes.

En nuestro laboratorio se había demostrado previamente que es posible generar un “sensor de glucosa” en el músculo esquelético a través de la co-expresión de glucoquinasa (Gck) e insulina (Ins). En las células musculares modificadas genéticamente, la expresión y secreción de niveles basales de insulina garantiza la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática, por lo que el transporte de glucosa no se convierte en un paso limitante. La captación de glucosa se produce a continuación por la rápida fosforilación de grandes cantidades de glucosa por la enzima Gck, que se activa mientras los niveles de glucosa son altos y se inactiva cuando éstos se normalizan, lo que evita la aparición de hipoglucemia. Una única administración intramuscular de vectores AAV de serotipo 1 (AAV1) que expresaban Ins y Gck permitió la corrección de la enfermedad tanto en ratones como en perros diabéticos durante 4 años de seguimiento.

La translación clínica de esta estrategia de terapia génica requiere una evaluación de la eficacia terapéutica y de la seguridad a más largo plazo, ya que las necesidades metabólicas varían a medida que los animales diabéticos envejecen.

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo un seguimiento del control de la glucemia durante el período de 4 a 8 años después de la administración de los vectores terapéuticos en perros diabéticos. Los perros tratados contrarrestaron la hiperglucemia sin necesidad de insulina exógena durante todo el período de seguimiento. La normalización metabólica sostenida se demostró mediante la evaluación plurianual de los niveles séricos de glucosa, insulina, proteínas glucosiladas (fructosamina), triglicéridos y colesterol, así como de la tolerancia a la glucosa. La persistencia tanto de los genomas virales como de la expresión de los transgenes terapéuticos y de la actividad Gck se detectaron en múltiples muestras de los músculos tratados. Además, no se observaron signos de patología en el análisis histopatológico de los mismos. Por tanto, estos resultados demuestran la funcionalidad y

seguridad a largo plazo de la administración intramuscular de los vectores AAV1 que codifican insulina y glucoquinasa para contrarrestar la diabetes.

En segundo lugar, se generaron vectores AAV duales que codificaban conjuntamente insulina y glucoquinasa. La generación de un vector dual permitirá: i) incrementar la eficacia terapéutica ya que todas las células modificadas genéticamente expresarán los dos componentes del “sensor de glucosa”; ii) disminuir las dosis virales, lo que minimizará la potencial toxicidad, facilitará el proceso de fabricación y disminuirá el coste; iii) simplificará los procesos regulatorios necesarios para una futura aplicación en pacientes humanos.

Los vectores duales mostraron mayor eficacia que la combinación de sus respectivos controles individuales. Entre los diferentes vectores duales generados, aquellos con las unidades transcripcionales en conformación opuesta mediaron mayores niveles de expresión de insulina y glucoquinasa que el resto de combinaciones. Además, los ratones diabéticos tratados con el vector en el que la unidad transcripcional miniCMV-insulina-SV40 estaba dispuesta en conformación opuesta a la unidad RSV-glucoquinasa-bGH (vector dual L) mostraron valores normales de glucemia en ayuno y tolerancia a la glucosa indistinguible a la de los animales sanos.

Así pues, los resultados obtenidos en el presente estudio sientan las bases para una futura translación a la clínica de una estrategia de terapia génica utilizando un único vector AAV1 dual que exprese ambos genes.

II. INTRODUCCIÓN

1. CONTROL DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

La glucosa es la principal fuente de energía utilizada por las células, donde es oxidada en un proceso catabólico denominado respiración celular, y la energía liberada se utiliza para sintetizar ATP. La respiración celular ocurre en células eucariotas y procariotas y está compuesta por tres vías principales: glucólisis, ciclo de Krebs y cadena de transporte de electrones (Mathews et al., 2012). La energía almacenada en forma de ATP puede utilizarse para impulsar procesos como la biosíntesis, el transporte de moléculas a través de las membranas celulares o en la locomoción (Mathews et al., 2012).

Alteraciones en los niveles de glucosa en sangre como la hiperglucemia o la hipoglucemia pueden tener graves consecuencias fisiológicas y se asocian con enfermedades como la diabetes. Para mantener la homeostasis, los niveles de glucosa en sangre están regulados principalmente por la secreción coordinada de insulina y glucagón del páncreas, los cuales activan e/o inhiben diferentes genes clave en el control del metabolismo de la glucosa.

Después de la ingesta, cuando aumentan los niveles de glucosa en sangre, hay tres procesos que actúan sinérgicamente para garantizar la homeostasis de la glucosa. En primer lugar, la glucosa estimula la producción de insulina y su liberación por las células β pancreáticas. En segundo lugar, la insulina aumenta la captación de glucosa por los tejidos periféricos como el músculo y el tejido adiposo. Por último, altas concentraciones de glucosa y la insulina inhiben la secreción de glucagón, y esto, a su vez, conduce a una reducción en la producción de glucosa hepática. En condiciones de ayuno, el glucagón, cuya secreción se incrementa, actúa junto con otros factores hormonales para aumentar la gluconeogénesis y la glucogenólisis y así, mantener la normoglucemia. Por tanto, cualquier alteración que afecte a las células β , al hígado, al músculo esquelético o a la funcionalidad del tejido adiposo puede alterar la homeostasis de la glucosa, causando intolerancia a la glucosa o incluso diabetes (DeFronzo et al., 1981).

El primer paso en la utilización de la glucosa por las células es su transporte a través de la membrana plasmática. Este proceso se realiza mediante proteínas transportadoras de glucosa (GLUT1 a GLUT5 y GLUT7) que están relacionadas estructuralmente (Mueckler, 1994; Wright et al., 1991). Una vez dentro de la célula, las hexoquinas fosforilan la

glucosa a glucosa-6-fosfato y posteriormente se almacena en forma de glucógeno o se metaboliza por glucólisis o por la vía de la pentosa fosfato.

1.1. Papel del músculo esquelético en la homeostasis de la glucosa

El músculo esquelético es un tejido importante en la homeostasis de la glucosa, ya que constituye alrededor del 40% de la masa corporal y es el sitio principal de almacenamiento de glucosa después de una ingesta, ya que capta el 60-70 % de la glucosa circulante de manera dependiente de insulina (DeFronzo et al., 1981).

Los transportadores de glucosa 1 y 4 (GLUT1 y 4) son los encargados del transporte de la glucosa en el músculo esquelético. El transportador GLUT1 se expresa a niveles bajos en dicho músculo y es el responsable de la captación de la glucosa basal independiente de la insulina, para garantizar así la disponibilidad mínima de carbohidratos (Mueckler, 1994; Rea and James, 1997; Wright et al., 1991). En contraste con GLUT1, las células musculares expresan niveles altos de transportadores GLUT4. En condiciones basales, este transportador se localiza en vesículas intracelulares y después de la ingesta en respuesta a la insulina, las vesículas se translocan a la membrana plasmática aumentando el transporte de la glucosa hacia el interior de la célula (Furtado et al., 2002). Esta translocación es el mecanismo clave por el cual la insulina estimula la captación de glucosa en el músculo (Rea and James, 1997).

Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada irreversiblemente a glucosa-6-fosfato por enzimas hexoquinasas. Las hexoquinasas I y II (HKI y HKII) son las isoenzimas predominantes en el músculo esquelético. La HKI es la responsable de la fosforilación basal de la glucosa y junto con GLUT1, controla la captación de glucosa no dependiente de insulina. HKII, junto con GLUT4, controla la absorción de glucosa dependiente de insulina. La insulina induce la translocación de GLUT4 a la membrana celular y aumenta la expresión de HKII (**Fig. 1**). Por otro lado, la actividad enzimática y la transcripción de HKII se inhiben cuando los niveles de insulina son bajos, o cuando se altera la señalización de insulina. La actividad enzimática de la HKII también puede ser inhibida alostéricamente por la glucosa-6-fosfato, que es el producto de su propia reacción. Esta inhibición es un mecanismo que permite controlar la utilización de glucosa en el músculo y en otros tejidos periféricos.

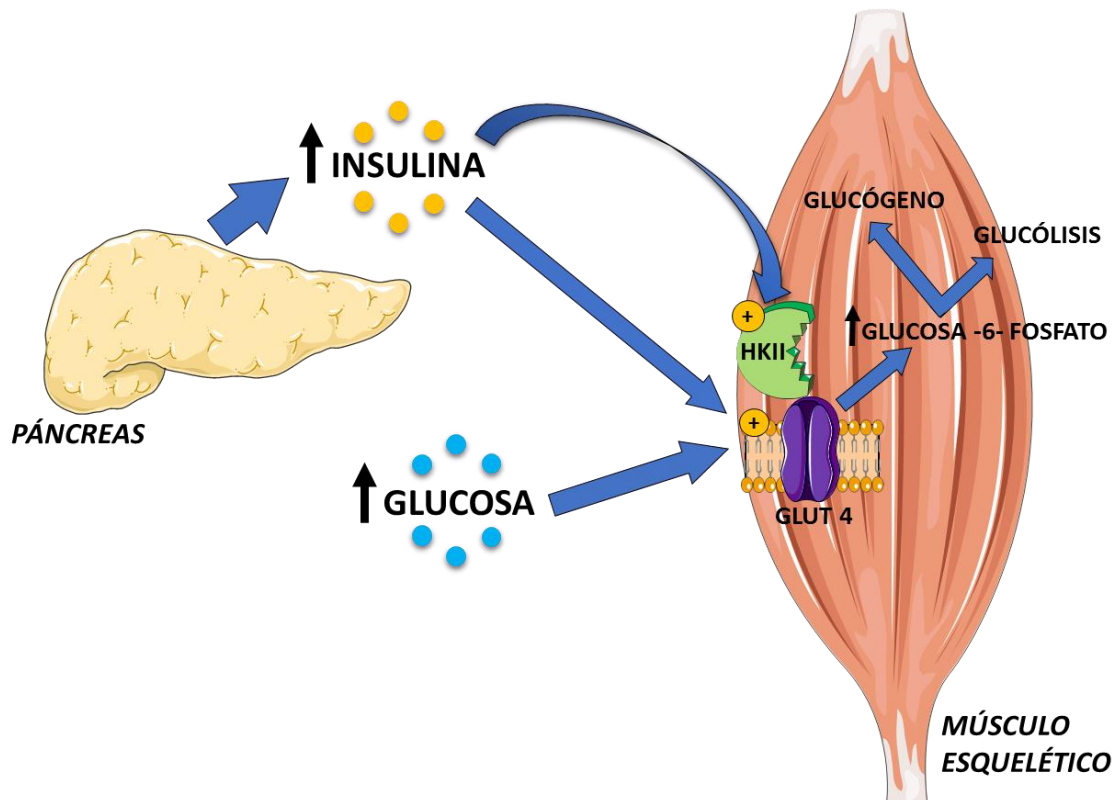


Figura 1. Papel del músculo esquelético en la homeostasis de la glucosa. En condiciones de alimentación, los niveles elevados de glucosa circulante conducen a la liberación de insulina por el páncreas. La insulina a su vez, induce la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática y aumenta la expresión de HKII, lo que en conjunto aumenta la captación de glucosa y su utilización por el músculo esquelético. Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato por la enzima HKII y se procesa para su almacenamiento en forma de glucógeno o se metaboliza mediante la glucólisis.

2. MÚSCULO ESQUELÉTICO

2.1. Estructura del músculo esquelético

Existen tres tipos distintos de musculatura: músculo esquelético, músculo cardíaco y músculo liso, los cuales tienen características similares y otras características que los diferencian. El músculo esquelético, también conocido como músculo estriado, se denomina así porque presenta estrías transversales debido a la disposición de las fibras musculares. La fibra muscular, también conocida como miofibra, es una sola célula multinucleada o sincicial que resulta de la fusión de cientos de mioblastos. Por lo tanto, una fibra muscular es una célula grande en comparación con otros tipos de células, siendo de 10-60 micras de diámetro y varios centímetros de largo. Las fibras musculares individuales están rodeadas por un tejido conectivo llamado endomisio (**Fig. 2**).

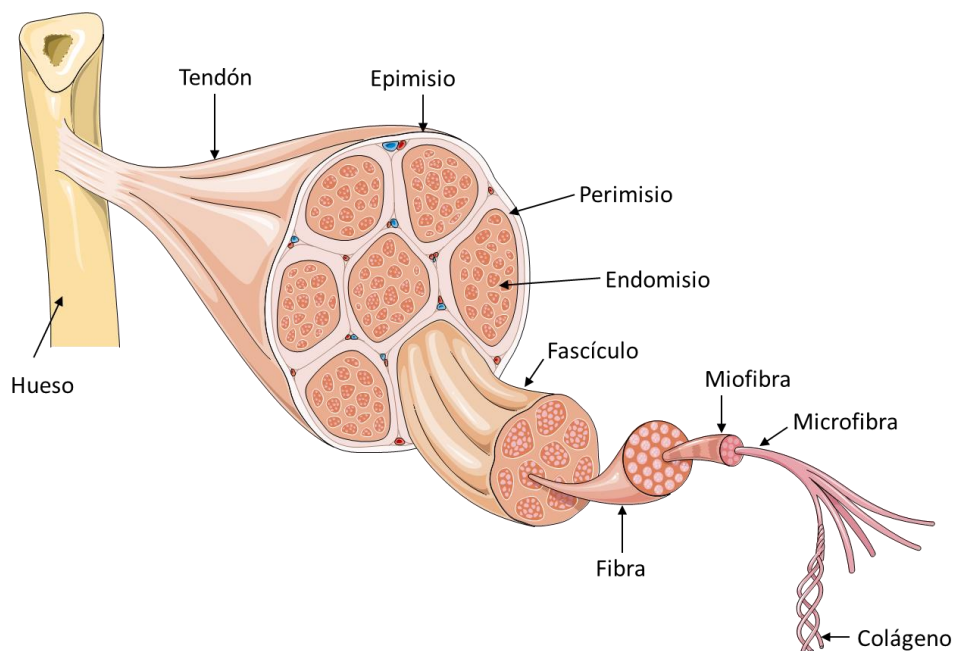


Figura 2. Estructura del músculo esquelético. Adaptado de *Servier Medical Art*.

Alrededor de 10 a 100 fibras musculares forman fascículos o haces, que están rodeados por otra capa de tejido conectivo denominada perimisio (**Fig. 2**). Finalmente, el músculo esquelético está formado por grupos de fascículos que están rodeados también por otra capa de tejido conectivo denominada epimisio (**Fig. 2**). Además de las fibras musculares, el músculo esquelético también está compuesto de numerosos vasos

sanguíneos y nervios. Además, las invaginaciones de la membrana plasmática del músculo, denominadas sarcolema, forman el sistema de túbulos transversales perpendiculares al eje de la fibra que facilitan la liberación de calcio y la contracción. Del mismo modo, los extremos de los músculos convergen en densas estructuras de tejidos conectivos, los tendones y las aponeurosis, que median la unión de los músculos al periostio de los huesos o al tejido conectivo de otros músculos (**Fig. 2**).

Las principales proteínas citoplasmáticas de una fibra muscular son la miosina y la actina, que se disponen en una unidad repetitiva llamada sarcómero (**Fig.3**). La interacción entre miosina y actina es la responsable de la contracción muscular y, por tanto, genera movimiento.

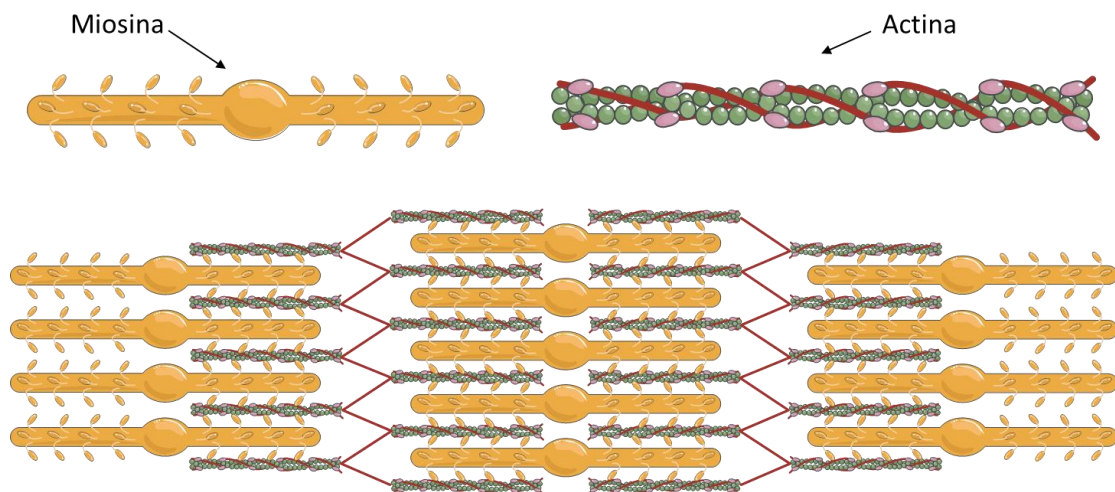


Figura 3. Disposición de las proteínas citoplasmáticas de una fibra muscular. Adaptado de *Servier Medical Art*.

2.2. Tipos de fibras musculares

El tipo de metabolismo del músculo depende completamente de la composición de los tipos de fibras individuales que lo componen pudiendo cambiar bajo ciertas condiciones de dieta, ejercicio y de enfermedad (Mann et al., 2010). El músculo esquelético se puede dividir en dos grandes categorías basadas en el tipo de miosina que expresan y las propiedades metabólicas asociadas a ellas. Las *fibras musculares de tipo I*, también denominadas fibras lentas, tienen una coloración rojiza debido a la presencia de la proteína mioglobina que almacena oxígeno y por estar altamente vascularizadas. Estas fibras tienen un alto contenido de mitocondrias, son adecuadas para la resistencia y no se fatigan rápidamente ya que utilizan el metabolismo oxidativo para generar ATP. Además,

se dividen a un ritmo lento, por lo que tienen una velocidad de contracción lenta (**Tabla 1**). Las *fibras de tipo II*, son blancas debido a la ausencia de mioglobina, ya que están menos vascularizadas y tienen menor número de mitocondrias, necesitando enzimas glucolíticas para su funcionamiento. Estas fibras, denominan rápidas, se pueden subdividir en tres tipos, *tipo IIa* y *tipo IIx* o *tipo IIb* (dependiendo de la especie), además, son eficientes para tiempos cortos de velocidad y potencia usando tanto metabolismo oxidativo como metabolismo anaeróbico. Las *fibras tipo II*, se fatigan más rápido que las *fibras tipo I* y son ricas en glucógeno y enzimas glucolíticas. Además, tienen una alta capacidad para generar ATP por oxidación (**Tabla 1**).

Tabla 1. Tipos de fibras musculares y sus características.

	Fibras tipo I	Fibras tipo IIa	Fibras tipo IIx	Fibras tipo IIb
Tiempo de contracción	Lenta	Moderadamente lenta	Rápida	Muy rápida
Resistencia a la fatiga	Alta	Bastante alta	Intermedia	Baja
Actividad	Aeróbica	Anaeróbico a largo plazo	Anaeróbico a corto plazo	Anaeróbico a corto plazo
Máxima duración	Horas	<30 minutos	<5 minutos	<1 minuto
Potencia	Bajo	Media	Alta	Muy alta
Densidad mitocondrial	Alta	Alta	Media	Baja
Densidad capilares	Alta	Intermedia	Baja	Baja
Capacidad oxidativa	Alta	Alta	Intermedia	Baja
Capacidad glucolítica	Baja	Alta	Alta	Alta
Sustrato	Triglicéridos	Fosfato de creatina, glucógeno	Fosfato de creatina, glucógeno	Fosfato de creatina, glucógeno

Adaptada de Mann et al., 2010.

Los músculos suelen ser una mezcla de todo tipo de fibras musculares (tipo I, tipo IIa, tipo IIb y IIx), pero sus proporciones varían dependiendo de la acción de cada músculo. Por ejemplo, los músculos responsables de la postura corporal suelen ser de tipo I lento.

El ejercicio es uno de los estímulos clave capaces de modificar el metabolismo y la plasticidad del músculo esquelético, por ejemplo, cambiando el uso de sustrato e induciendo transiciones de tipo de fibra. En primer lugar, el ejercicio aumenta la capacidad de captar glucosa de manera independiente a la insulina. Además, el ejercicio estimula la

translocación de GLUT4, por lo que estimula la absorción de glucosa dependiente de insulina. El ejercicio también conduce a la activación de varias vías de señalización en el músculo, que son comunes a la señalización de la insulina, lo que puede afectar al metabolismo de la totalidad del músculo. La ausencia de señalización de insulina en el músculo diabético tiene muchas consecuencias, tales como el aumento de proteólisis y el uso de sustrato alterado, que pueden afectar potencialmente al ejercicio (Mann et al., 2010).

3. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por la hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos. La hiperglucemia crónica provoca complicaciones microvasculares graves como retinopatía, nefropatía y neuropatía, y complicaciones macrovasculares como los accidentes cerebrovasculares o el infarto de miocardio (*American Diabetes Association*, 2017).

Actualmente, las cifras de prevalencia de la diabetes son preocupantes. En 2015, se determinó que existía medio millón de niños menores de 14 años con diabetes tipo 1. También, se estimó que unos 415 millones de adultos de entre 20 y 79 años sufrían diabetes y 318 millones de adultos presentaban tolerancia a la glucosa alterada en todo el mundo. La *International Diabetes Federation* (IDF) pronostica que en el año 2040 habrá 642 millones de pacientes (IDF, 2015). La diabetes es una causa importante de mortalidad y morbilidad. En 2015, a causa de la diabetes murieron 5 millones de personas en el mundo (IDF, 2015). Además, la diabetes supone una gran carga económica para los sistemas de salud individuales y nacionales. En 2015, la diabetes representó el 12% del gasto sanitario mundial dedicado al tratamiento de la enfermedad y de las complicaciones relacionadas, que representan la mayor parte de los gastos totales (IDF, 2015).

La gran mayoría de los pacientes diabéticos se dividen principalmente en dos grupos: diabéticos tipo 1 y diabéticos tipo 2. La diabetes tipo 1 está causada por una deficiencia absoluta de secreción de insulina como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. La diabetes tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la insulina por parte de los tejidos periféricos y por una secreción anormal de insulina, debido a un

deterioro de la función de las células β y una reducción de la masa de las células β (Butler et al., 2003).

Además de la diabetes tipo 1 y 2, la clasificación actual de la enfermedad incluye otros trastornos menos frecuentes, como la diabetes gestacional, que durante muchos años se definió como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que fuera reconocido por primera vez durante el embarazo, independientemente de si la condición podía haber precedido al embarazo o persistido después de este. La actual epidemia de obesidad y diabetes ha conllevado un aumento del número de mujeres en edad fértil que sufren diabetes tipo 2, aumentando el número de mujeres embarazadas con diabetes tipo 2 sin diagnosticar. Por ello, se recomienda realizar test de diabetes durante el primer trimestre a mujeres con factores de riesgo de diabetes tipo 2 (American Diabetes Association, 2017). Las mujeres con niveles de glucosa ligeramente elevados son clasificadas con diabetes mellitus gestacional, mientras que las mujeres con niveles de glucosa en la sangre sustancialmente elevados son clasificadas con diabetes mellitus en el embarazo (IDF, 2015). Otros tipos de diabetes pueden ser causadas por defectos monogénicos que afectan a la función de las células β . Estas formas de diabetes están caracterizadas por la aparición de hiperglucemia durante la niñez o en adultos jóvenes, incluyen la *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY), la Diabetes neonatal permanente (PNDM) y la Diabetes neonatal transitoria (TNDM) (WHO, 1999). Las MODY son el tipo de diabetes causadas por defectos monogénicos mejor caracterizadas, ya que son un grupo de enfermedades que se heredan siguiendo un patrón autosómico dominante que se presenta antes de los 25 años de edad. La forma más común se asocia a mutaciones en un factor de transcripción hepático, el factor nuclear de hepatocitos HNF-1 α (MODY 3), la segunda forma más común está asociada a mutaciones en el gen de la glucoquinasa (MODY 2). Las formas menos comunes son el resultado de mutaciones de otros factores de transcripción, como HNF-4 α , HNF-1 β , el factor promotor de insulina (Pdx1) y Neuro D1 (Hattersley et al., 2006; Thanabalasingham and Owen, 2011).

3.1. Diabetes tipo 1

De acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes tipo 1 se divide en dos subtipos: diabetes autoinmune (tipo 1 más frecuente) y diabetes idiopática (tipo 1B) (Alberti and Zimmet, 1998). La diabetes idiopática es menos frecuente, no se conoce la causa y ocurre mayoritariamente en individuos asiáticos o africanos.

La diabetes tipo 1, conocida anteriormente como diabetes mellitus insulino-dependiente o diabetes juvenil, se produce debido a una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, causando deficiencia absoluta de insulina endógena. Las personas con diabetes tipo 1A son dependientes de insulina exógena para sobrevivir y son susceptibles a la cetosis (*Textbook of Diabetes, Fifth Edition, 2017*). Esta forma de diabetes representa el 5-10 % del total de pacientes diabéticos, y en general se desarrolla durante la infancia o la adolescencia (American Diabetes Association, 2017). En ausencia de insulina, se produce una reducción de la captación y utilización de la glucosa por los tejidos periféricos sensibles a la insulina, tales como el tejido muscular y adiposo, lo que conduce a hiperglucemia. Además, los niveles de glucagón son altos, lo que aumenta la producción hepática de glucosa a través de las vías glucogenolítica y gluconeogénica, contribuyendo así a la hiperglucemia. Por otra parte, la falta de insulina endógena provoca una degradación significativa de los triglicéridos del tejido adiposo y los ácidos grasos que se liberan se convierten en cuerpos cetónicos en el hígado, lo que puede conducir a cetoacidosis si se produce su acumulación. Por tanto, la falta de tratamiento con insulina da lugar a hiperglucemia y cetoacidosis, que a su vez puede conducir a un estado comatoso, y eventualmente, a la muerte del paciente si no se administra insulina. Los síntomas de hiperglucemia marcada incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia y visión borrosa. A pesar del tratamiento con insulina exógena, la hiperglicemia crónica puede persistir causando el desarrollo de las severas complicaciones secundarias a largo plazo.

3.2. Patogenia de la diabetes tipo 1

La presentación clínica de la diabetes tipo 1 es precedida por un período asintomático de duración muy variable. La destrucción agresiva de las células β pancreáticas puede conducir a la manifestación de la enfermedad en pocos meses en lactantes y niños pequeños, mientras que en otras personas el proceso puede continuar durante años antes de la manifestación de la enfermedad (Knip et al., 2005).

La diabetes tipo 1 se desarrolla como consecuencia de una combinación de predisposición genética, factores ambientales desconocidos y eventos estocásticos (Bluestone et al., 2010). Los datos obtenidos en modelos de rata BioBreeding (BB) y en ratón diabético no obeso (NOD), conjuntamente con el análisis de muestras de biopsia o autopsia de pacientes diabéticos, han permitido desarrollar un modelo más completo sobre los principales eventos inmunológicos que ocurren durante el desarrollo de la diabetes tipo 1 (**Fig. 4**) (Van Belle et al., 2011).

La base etiológica de la patogénesis de la diabetes tipo 1 en humanos no se conoce. Existen una serie de teorías basadas en datos humanos y modelos animales que se han propuesto para poder explicar cómo se inicia la autoinmunidad de las células β y como en un punto determinado el progreso en la deficiencia de insulina lleva a la hiperglucemia. Estas teorías incluyen el mimetismo molecular, que resulta de la reactividad cruzada de antígenos virales o antígenos dietarios con antígenos de células β que impulsa la respuesta inmune y la expresión de antígenos de célula β disfuncionales. También, existe la teoría de que la microflora intestinal conduce a un deterioro de la respuesta inmune, la expresión en el timo de antígenos disfuncionales de célula β y de los ganglios linfáticos pancreáticos (Rowe et al., 2011).

Se ha descrito que al iniciarse la infiltración del páncreas, células dendríticas, macrófagos y *natural killers* junto con células B autoreactivas se infiltran en el páncreas (Bluestone et al., 2010). A continuación, en los ganglios linfáticos de drenaje pancreático, los antígenos de islotes son presentados por las células presentadoras de antígeno a las células T CD4⁺, que a su vez activan células T CD8⁺ citotóxicas en nódulos linfáticos (**Fig. 4**) (Van Belle et al., 2011; Bluestone et al., 2010). Las células β regulan positivamente el interferón α (IFN- α) y a consecuencia de esto se activa el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I que expone a las células β a un ataque de las células T CD8⁺ autoreactivas (Van Belle et al., 2011). Estas células T CD8⁺ activadas vuelven a la

circulación sanguínea llegando al páncreas donde dañan los islotes, lo que conduce a la liberación de antígenos “*epitope spreading*” y a la presentación de nuevos antígenos al sistema inmunológico que confiere nuevas especificidades a las células T CD4⁺, lo que conduce a una nueva activación de células T CD8⁺. Esto provoca más destrucción de células β y el ciclo comienza de nuevo (Van Belle et al., 2011) (Fig. 4).

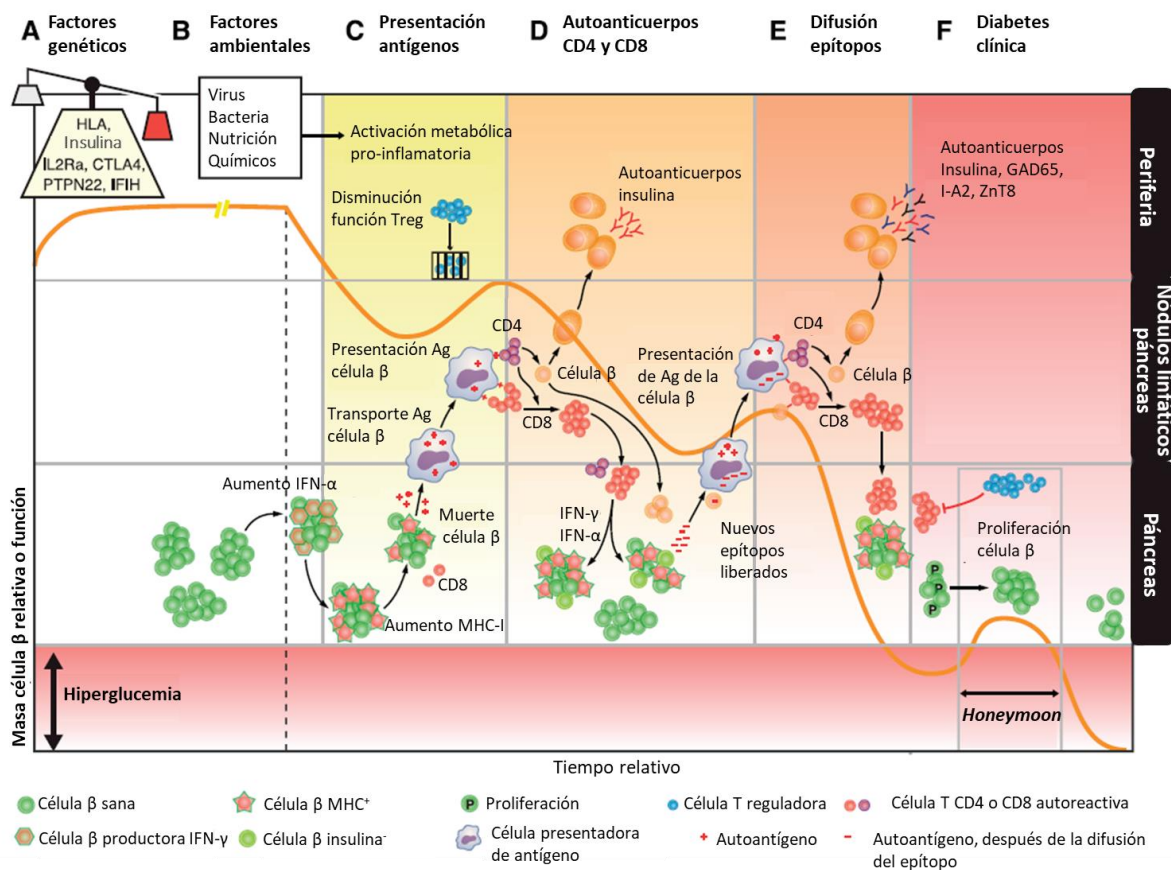


Figura 4. Patogénesis de la diabetes tipo 1. Representación esquemática de las diferentes fases inmunológicas (columnas de la parte superior) y los sitios relevantes donde se producen (filas de la derecha) en la diabetes tipo 1. Cuando la masa o la función de las células β (representado por una línea naranja) cae hasta valores situados en la franja roja el individuo es diagnosticado clínicamente con diabetes tipo 1. Treg: linfocitos T reguladores; Ag: antígeno; IFN-α/γ: interferón α/γ; MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad I. (Adaptado de van Belle et al., 2011).

En el caso de las células B, su papel es menos claro, aunque estudios en el modelo de ratón NOD que demuestran que los anticuerpos y los linfocitos B contribuyen a la patogénesis debido a la producción de autoanticuerpos y porque actúan como eficaces células presentadoras de antígeno (Bluestone et al., 2010; Miao et al., 2007). Se ha descrito también que las células *natural killer* (Rodacki et al., 2006; Shalaby et al., 2017) y los mastocitos (Martino et al., 2015) se pueden encontrar con una actividad y en número

anormal. Los anticuerpos descritos son Autoanticuerpos contra la insulina (IAAs) o anticuerpos dirigidos contra el antígeno asociado a insulinoma 2 (I-A2 o ICA512), antígeno asociado a insulinoma 2 β (IA2 β), ácido glutámico decarboxilasa 65 (GAD65), autoantígeno de células del islote (ICA69), trisialota-gangliósido GT3, gangliósido GM2-1 y el transportador de zinc 8 (Van Belle et al., 2011; Knip et al.; Miao et al., 2007). El número y la función de las células T reguladoras (Treg) se altera durante la progresión de la enfermedad, lo que sugiere que la progresión de la destrucción autoinmune puede ser una consecuencia del desequilibrio de las células Treg y T efectoras (Bluestone et al., 2010). La presentación clínica de la diabetes ocurre en la etapa final del desarrollo de la enfermedad cuando entre el 60 y el 90% de las células β han sido destruidas o son disfuncionales (Van Belle et al., 2011).

En algunos casos se puede detectar una fase temporal denominada *Honeymoon* donde las células β restantes compensan la hiperglucemia a través de su proliferación y de un incremento en la secreción de insulina. Finalmente, estas células no tendrán suficiente capacidad para contrarrestar la hiperglucemia, acabarán muriendo y dando lugar a hiperglucemia crónica (Abdul-Rasoul et al., 2006; Van Belle et al., 2011).

3.3. Etiología genética de la diabetes tipo 1

En estudios realizados en recién nacidos con mayor riesgo asociado a padecer diabetes tipo 1, se ha demostrado una gran asociación genética entre la región HLA en el cromosoma 6p21 y el primer autoanticuerpo de célula β (Krischer et al., 2015). Se ha descrito también que el autoanticuerpo IAA de islote está asociado fuertemente con HLA-DR4-DQ8 y que el autoanticuerpo GADA está asociado a la región HLA-DR3-DQ2 (Ilonen et al., 2013).

En personas con diabetes tipo 1, los genes HLA representan al menos el 50% del riesgo familiar de padecer la enfermedad (Todd, 1995). Ciertos alelos de la región HLA, como HLA de clase II DR y los alelos DQ se presentan principalmente en asociación específica entre sí, es un fenómeno conocido como desequilibrio de ligamiento. La asociación de HLA con diabetes tipo 1 se describe por haplotipo o genotipo del individuo (Thomson et al., 2007).

El mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 lo confiere el genotipo de heterocigosidad de los dos halotipos de alto riesgo HLA de clase II: DR3-DQ2 (DRB1*03-

DQA1*0501-B1*0201 y DR4-DQ8 (DRB1*04-DQA1*0301-B1*0302) (Hermann et al., 2004; Thomson et al., 2007). En más del 95% de individuos con diabetes tipo 1 menores de 30 años y entre el 40-50% de la población general se han encontrado uno o ambos halotipos (Hermann et al., 2004).

La secuenciación de todo el genoma humano ha hecho posible que con estudios “*genome-wide association studies*” (GWAS) puedan confirmar la fuerte asociación entre HLA e identificar más de 50 genes no HLA que están asociados con el riesgo de padecer diabetes tipo 1 (Cooper et al., 2012; Zanda et al., 2014). Además, se ha descrito que los factores genéticos no HLA están esencialmente relacionados con la función de los linfocitos T y B (Concannon et al., 2009).

3.4. Factores ambientales en la diabetes tipo 1

En la literatura sobre los factores ambientales implicados en la diabetes tipo 1, se sugiere que las infecciones anteriores al inicio clínico de la enfermedad se relacionan más con la aceleración del proceso que con el desencadenamiento de éste. Se espera que niños con múltiples autoanticuerpos contra células β tengan una disminución significativa del número de células β . En el momento que éstos sufren una infección, la demanda de insulina tiende a incrementarse y se especula que el inicio clínico de la diabetes tipo 1 puede explicarse por la fatiga de las células β . Estudios en gemelos idénticos muestran una tasa de concordancia de entre el 50-70% (Rakyan et al., 2011; Rowe and Leslie, 1995) y la estacionalidad de la incidencia de diabetes se explica por un efecto acelerador más que por infecciones que pueden inducir a la autoinmunidad de las células β .

Los factores ambientales incluyen factores maternos, tales como infecciones durante la gestación; maternidad a edades tardías o incompatibilidades en grupo sanguíneo; infecciones víricas, como virus de las paperas, el virus de la rubeola, enterovirus, virus coxsackie B, rotavirus, citomegalovirus o virus Epstein-Barr; factores dietéticos como la leche bovina o lactancia corta, cereales, alto contenido en proteínas o deficiencia en vitamina D; peso elevado al nacer y la tasa de crecimiento, estrés psicológico durante la gestación o durante la niñez; y sustancias tóxicas como la aloxana o la estreptozotocina (*Textbook of Diabetes, Fifth Edition, 2017*).

Por otro lado, la hipótesis de la higiene postula que al haberse creado un ambiente libre de patógenos se reduce la exposición a los patógenos y sus productos. Según esta hipótesis, el sistema inmunológico de los niños tiende a ser inmaduro y por este motivo tienen reacciones autoinmunes (Bluestone et al., 2010; Devendra et al., 2004). Además, también se postula que los niños reciben niveles bajos de anticuerpos de sus madres y cuando estos se exponen a infecciones, como por ejemplo a los enterovirus, incrementa su riesgo de padecer diabetes tipo 1 (Lynch et al., 2008).

Por tanto, el poder diferenciar los factores ambientales que desencadenan la autoinmunidad de aquellos que aceleran el proceso de la enfermedad en niños con múltiples autoanticuerpos es importante para poder conocer mejor los factores implicados en el inicio de la enfermedad.

3.5. Complicaciones a largo plazo asociadas a la diabetes tipo 1

En pacientes con diabetes tipo 1 es difícil poder mantener unos niveles glucémicos adecuados que protejan al individuo de las complicaciones a largo plazo de la diabetes, derivadas de la hiperglucemia crónica. Aunque en los últimos años ha mejorado la esperanza de vida de los pacientes con diabetes tipo 1, ésta sigue siendo inferior a la de la población que no padece esta enfermedad (Stene, 2016).

La hiperglucemia crónica provoca la denominada angiopatía diabética, que se define como el daño tanto estructural como funcional de un órgano como resultado de cambios en el sistema vascular. La angiopatía diabética se divide en microangiopatía o complicaciones microvasculares graves que afectan a capilares y arteriolas en la retina (retinopatía), los riñones (nefropatía) y los nervios (neuropatía); y en macroangiopatía o complicaciones macrovasculares las cuales afectan arterias en el cerebro (accidentes cerebrovasculares), en el corazón (infarto de miocardio) y en las extremidades inferiores (enfermedad vascular periférica). Las complicaciones microvasculares son cuantitativamente más frecuentes en pacientes con diabetes tipo 1, mientras que las complicaciones macrovasculares suelen aparecer más en pacientes con diabetes tipo 1 (*Textbook of Diabetes, Fifth Edition, 2017*).

3.5.1. Complicaciones microvasculares en la diabetes tipo 1

La principal característica morfológica de las complicaciones microvasculares diabéticas es el engrosamiento de la membrana basal de los capilares y de las arteriolas principalmente en la retina, riñón y nervios. El grado de engrosamiento aumenta con la duración de la diabetes. Este engrosamiento en la membrana basal de los capilares y arteriolas se puede apreciar en todos los pacientes con diabetes tipo 1, pero clínicamente los daños sintomáticos en los órganos son mucho menos frecuentes (Skyler, 1996) (Nathan, 1994).

Con el paso del tiempo, se va produciendo un estrechamiento progresivo y eventualmente una oclusión del lumen vascular que resulta en el deterioro de la perfusión, isquemia y disfunción de los tejidos afectados. Varios procesos contribuyen a la oclusión microvascular. Uno de los primeros procesos, es el incremento de la permeabilidad vascular, permitiendo la extravasación de las proteínas plasmáticas que se acumulan en las paredes de los vasos. Además, la producción de matriz extracelular por células perivasculares como los pericitos en la retina y por las células mesangiales en los glomérulos aumenta. Como resultado, la membrana basal se engrosa en muchos tejidos, incluyendo los capilares de la retina y la *vasa nervorum*, junto con la matriz mesangial de los glomérulos renales. La hipertrofia y la hiperplasia de las células de la musculatura lisa endotelial, mesangial y arteriolar también contribuyen al engrosamiento de la pared de los vasos. Finalmente, el incremento de la coagulabilidad y de la adhesión de plaquetas y leucocitos en la pared endotelial conduce a la formación de microtrombos y a la oclusión del lumen. El estrechamiento y bloqueo progresivo del lumen microvascular se acompaña de la pérdida de células microvasculares. En la retina, la diabetes induce la apoptosis de las células de Müller y de las células ganglionales (Hammes et al., 1995), de pericitos y de células endoteliales (Mizutani et al., 1996). En el glomérulo, la oclusión capilar generalizada y la disminución de la función renal están asociadas a la pérdida de podocitos. En la *vasa nervorum* de enfermos diabéticos, degeneran las células endoteliales y los pericitos (Giannini and Dyck, 1993) y parecen que preceden a anomalías funcionales de los en el sistema nervioso periférico (Giannini and Dyck, 1995).

En el caso de las complicaciones oculares asociadas a la diabetes tipo 1 se incluyen parálisis repentinas de músculos del ojo resultando en diplopía que normalmente desaparece espontáneamente en unas pocas semanas. Las personas con diabetes también

tienen motilidad reducida de la pupila secundaria a la neuropatía autonómica, y pueden desarrollar cataratas a mucha más temprana edad que la población que no sufre esta enfermedad metabólica (Obrosova et al., 2010). La retinopatía diabética es una complicación microvascular que se desarrolla en la retina y es una enfermedad grave que constituye una de las causas más frecuentes de ceguera en el mundo (Fong et al., 2004). Se caracteriza por lesiones morfológicas en la retina relacionadas con alteraciones en el flujo sanguíneo de la retina (Curtis et al., 2009).

La nefropatía diabética se refiere a la condición crónica desarrollada durante muchos años, que se caracteriza por el aumento gradual de la excreción de albúmina, de la presión arterial y del riesgo cardiovascular, la disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG) y la consecuente insuficiencia renal crónica (Krolewski et al., 2014; Molitch et al., 2010).

La neuropatía diabética incluye manifestaciones en las partes somáticas y/o autónomas del sistema nervioso periférico (ADA, 1988). La neuropatía diabética se clasifica en neuropatía periférica y en neuropatía autonómica. Dentro de la neuropatía periférica diabética, la polineuropatía sensitiva (DSPN) es la que tiene más manifestación clínica, afecta al 30 % de pacientes hospitalizados con diabetes y al 20% de la población diabética en general (Ziegler et al., 2014). El DSPN está relacionado con el deterioro de las extremidades y con limitaciones funcionales como la capacidad de caminar (Resnick et al., 2000). En el caso de la neuropatía autonómica diabética se puede ver afectado cualquier órgano inervado por el sistema nervioso autónomo. Los síntomas generalmente ocurren relativamente tarde en el curso de la diabetes y hasta hace dos décadas no se ha dispuesto de métodos cuantitativos y fiables no invasivos para poder evaluar la neuropatía autonómica diabética. Las últimas etapas de la neuropatía autonómica diabética están asociadas a la morbilidad y al incremento de mortalidad, por lo que la detección y la prevención de esta complicación es esencial. Síntomas como taquicardia en reposo, síntomas gastrointestinales (dispepsia, estreñimiento, diarrea, incontinencia fecal), trastornos de la función de la vejiga, disfunción sexual, hipoglucemia, desorden de secreción de sudor y fluctuaciones de la glucosa en sangre son indicativos para diagnosticar la neuropatía autonómica diabética (*Textbook of Diabetes, Fifth Edition, 2017*).

3.5.2. Complicaciones macrovasculares en la diabetes tipo 1

Aunque las complicaciones macrovasculares suelen aparecer más en pacientes con diabetes tipo 2, son también importantes en pacientes con diabetes tipo 1, por la gravedad de estas. Ya que, las principales causas de mortalidad en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2 son la muerte por accidente cerebrovascular y por infarto de miocardio (Dale et al., 2008; Nathan and et al., 2005). El riesgo de padecer un accidente cerebrovascular aparece 10 años antes en pacientes diabéticos que en personas no diabéticas (Hägg-Holmberg et al., 2017).

Factores hemodinámicos y metabólicos son los responsables del desarrollo y progresión de la enfermedad macrovascular en la diabetes. El sistema renina-angiotensina es uno de los factores hemodinámicos implicados. Se ha demostrado que tiene un papel fundamental en la aterosclerosis asociada a la diabetes, no obstante, otros factores como hormonas vasoactivas, en concreto la endotelina y los sistemas urotensina (Bousette et al., 2004; Hassan et al., 2005) también se han implicado en la enfermedad macrovascular diabética. El estrés oxidativo y la disminución antioxidante son factores críticos que conducen a procesos aterogénicos en la diabetes (Gray and Jandeleit-Dahm, 2014). Además, respuestas inmuno-inflamatorias que implican a factores como el factor de necrosis tumoral (TNF), el “*apoptosis inducing ligand*” (TRAIL) y el sistema de complemento también están involucrados en la enfermedad macrovascular diabética.

La exposición crónica del endotelio vascular a la hiperglucemia induce una respuesta inflamatoria que implica la adhesión y trans migración de monocitos a través de la pared vascular en el espacio subendotelial (Libby, 2001). Asimismo, la generación acelerada y deposición vascular de “*Advanced glycation end products*” (AGEs) además de las interacciones con el receptor “*receptor for advanced glycation end products*” (RAGE) en la diabetes inician reacciones oxidativas que promueven la oxidación de proteínas de baja densidad (LDL) (Basta et al., 2004). Además, los monocitos se diferencian a macrófagos, los cuales, a través de la absorción de lípidos, se transforman en células espumosas y se acumulan en la pared de los vasos. El proceso aterosclerótico temprano da lugar a la formación de lesiones “*fatty streak*”, las cuales se caracterizan por infiltrarse en el músculo liso vascular (VSMC), por la formación de núcleos necróticos y acumulación de otros lípidos (Libby, 2001). En humanos, estas lesiones pueden manifestarse en inestabilidad y rotura de placa incluyendo hemorragias intraplaca aumentando la trombogenicidad.

4. TRATAMIENTOS DE LA DIABETES TIPO 1

Los principales tratamientos actuales para los pacientes con diabetes tipo 1 incluyen terapias de reemplazamiento de insulina endógena a través de la inyección de la hormona o mediante bombas que liberan insulina. Aunque se ha demostrado que el trasplante de páncreas es capaz de normalizar la glucemia, la necesidad de inmunosupresión crónica y la falta de donantes hacen que esté indicado especialmente para pacientes que requieren también trasplante renal o para aquellos pacientes con cetoacidosis o hipoglucemia recurrentes. Asimismo, existen nuevas aproximaciones terapéuticas en fase de desarrollo como el trasplante de islotes o la terapia celular.

4.1. Administración de insulina exógena

La vía de administración mediante inyección subcutánea se ha convertido en la más utilizada para la administración de insulina por su facilidad de uso y por la reproducibilidad de su cinética de absorción. Actualmente existen cuatro tipos de insulina para el tratamiento de la diabetes tipo 1 en función de su farmacocinética: insulina de acción rápida, insulina regular o de acción breve, insulina de acción intermedia e insulina de acción prolongada (**Tabla 2**).

La *Insulina de acción rápida* empieza a tener efecto entre 5 y 15 minutos después de la administración, tiene su máximo efecto al cabo de una hora y es eficaz durante cuatro a seis horas. Se utiliza para contrarrestar la hiperglucemia postprandial.

La *Insulina regular o de acción breve* generalmente llega al flujo sanguíneo entre 30 y 60 minutos después de la inyección, tiene su máximo efecto a las dos o tres horas después de la administración y es eficaz durante aproximadamente entre ocho y diez horas, resultando en un mejor control postprandial con menos episodios de hipoglucemia.

La *Insulina de acción intermedia*, generalmente llega al flujo sanguíneo aproximadamente de dos a cuatro horas después de la inyección, tiene su máximo efecto al cabo de cuatro a diez horas y es eficaz durante aproximadamente doce a dieciocho horas. Esta insulina se ha utilizado tradicionalmente como insulina basal antes de la aparición de los análogos de insulina de acción prolongada.

Finalmente, la *Insulina de acción prolongada* generalmente llega a la sangre varias horas después de la administración y tiende a mantener bajo el nivel de glucosa durante un periodo de 24 horas (*insulina glargina*). Existe una insulina de acción prolongada “*ultra long-acting insulin*”, (*Insulin degludec*), que mantiene los niveles de glucosa bajos más allá de 42 horas, con un perfil farmacodinámico plano y estable, reduciendo la variabilidad diaria en el efecto reductor de la glucosa (Landstedt-Hallin, 2015). Asimismo, se han desarrollado nuevas insulinas, denominadas insulinas concentradas (*Humulin-R U500, degludec U200, glargine U300*), que proporcionan un efecto sostenido de reducción de glucosa sin aumentar el riesgo de hipoglucemia, con menor variabilidad intraindividual y potencial flexibilidad en la estrategia de dosificación. Estas insulinas permiten inyectar un bajo volumen, reducen el riesgo de padecer hipoglucemia, producen una bajada paulatina de la glucosa permitiendo instaurar horarios alternativos de dosificación (Lamos et al., 2016).

Tabla 2. Propiedades farmacocinéticas de las diferentes insulinas.

Tipos de insulinas	Inicio	Pico	Duración
Insulinas de acción rápida	5-15 min	30-90 min	4-6 h
Insulina lispro			
Insulina aspart			
Insulina glulisine			
Insulina humana inhalada			
Insulina de acción breve	30-60 min	2-3 h	8-10 h
Insulina regular humana			
Insulina de acción intermedia	2-4 h	4-10 h	12-18 h
Neutral protamine Hagedon			
Insulinas de acción prolongada			
Insulina detemir	1-2 h	Ninguno †	12-24 h
Insulina glargina (U-100)	2-4h	Ninguno †	20-24 h
Insulina glargina (U-300)	6 h	Ninguno	>24 h
Insulina degludec	30-90 min	Ninguno	>24 h

† Tanto la insulina detemir como la insulina glargina (U-100) en algunas personas pueden producir un pico, especialmente en dosis más altas. Adaptación de *Synopsis of 2017 ADA Standards of Medical Care in Diabetes*.

El tratamiento con múltiples dosis de insulina o terapia intensiva es el más utilizado para tratar de mimetizar el perfil fisiológico de la insulina endógena en pacientes de diabetes tipo 1. Este tratamiento ha consistido tradicionalmente en la administración de preparados de insulina de larga duración para paliar la necesidad de insulina basal, conjuntamente con la administración de preparados de insulina rápida con cada comida.

Clásicamente la insulina de larga duración o basal ha sido la *neutral protamine Hagedorn* (NPH o ultralente) administrada una o dos veces al día como insulina basal, con bolos de insulina humana regulares antes de las comidas (Daneman, 2006). En la actualidad, con la disponibilidad de nuevos análogos de insulina de acción rápida y de acción prolongada, las rutinas de múltiple inyección diaria usan insulina glargina o detemir como insulina basal e insulina aspart como bolos antes de las comidas (Bergenstal, 2004; Daneman, 2006, ADA Standards of Medical Care in Diabetes). Actualmente también se dispone de preparaciones de insulina lenta y rápida premezcladas a diferentes ratios que van desde 20:75 a 50:50 de ambas insulinas, respectivamente. Estas preparaciones son típicamente administradas dos veces al día, en el desayuno y la cena, aunque pueden llegar a administrarse hasta tres veces diarias. Aunque estas preparaciones tienen la ventaja de reducir el número de inyecciones diarias y no requerir una monitorización tan frecuente de la glucosa, en contrapartida, producen una administración de insulina menos fisiológica, así como una menor flexibilidad para acomodarse a diferentes actividades diarias, horarios y cantidad de comida ingerida. Pese a estas desventajas, las preparaciones de insulinas mezcladas son especialmente populares entre jóvenes y adolescentes, menos propensos a un control intensivo.

Sin embargo, los pacientes que realizan un tratamiento intensivo con insulina presentan un mayor riesgo de hipoglucemia (particularmente los pacientes diabéticos muy jóvenes y ancianos), principal paso limitante para lograr un mejor control glucémico (DCCT, 1993; Daneman, 2006). Además, se ha descrito que en pacientes que reciben terapia intensiva con insulina, la tasa de desarrollo de complicaciones secundarias continúa siendo elevada (Nathan et al., 2009).

4.2. Terapia con bomba de insulina

Aunque la vía de administración mediante inyección subcutánea es la más utilizada, actualmente han aparecido dispositivos electrónicos que permiten administrar continuamente insulina. Estos dispositivos están compuestos por una bomba externa conectada a un sistema de infusión de insulina subcutánea (CSII) que infunde un análogo de insulina de acción rápida (Bergenstal, 2004). Este sistema, puede proporcionar una reducción clínicamente importante de los niveles de HbA1c, en comparación con la terapia convencional mediante múltiples inyecciones diarias, especialmente en individuos con episodios de hipoglucemias graves, y con una respuesta variable de la insulina (Bruttomesso et al., 2009; Hanaire et al., 2008; Pickup and Sutton, 2008; White, 2007). Este sistema también tiene efectos positivos sobre la calidad de vida y la posibilidad de ajustar la administración de insulina en función de la actividad física o la ingesta de alimentos (Bruttomesso et al., 2009; White, 2007). Sin embargo, estos sistemas tienen varias desventajas que incluyen la posibilidad de tener problemas técnicos con la bomba, sobre todo si los pacientes son privados de insulina durante la noche, provocando el desarrollo de cetoacidosis diabética. Otras problemáticas de estos sistemas, son la posibilidad de infección o inflamación en el lugar de infusión, el aumento de peso corporal, la necesidad de personal especialmente entrenado y el aumento de los costes de este sistema de infusión en comparación con la terapia convencional mediante múltiples inyecciones diarias (Bruttomesso et al., 2009; White, 2007).

Actualmente, se está trabajando en la mejora de sistemas cerrados denominados “páncreas artificiales”, donde un sensor subcutáneo mide continuamente los niveles de glucosa en sangre, y a través de una bomba de insulina con una aguja fina implantada subcutáneamente se libera la cantidad de insulina requerida (Keenan et al., 2010, Cinar, 2017).

No obstante, estos tratamientos no previenen el desarrollo de complicaciones secundarias a largo plazo derivadas de la hiperglucemia crónica. Además, los pacientes están expuestos a episodios de hipoglucemia, que son potencialmente mortales, ya que con esta terapia no se llega a obtener el sofisticado nivel de regulación fisiológico.

4.3. Trasplante de páncreas

Existen tres tipos principales de trasplante de páncreas: 1) trasplante simultáneo de páncreas y riñón, en el que ambos órganos son trasplantados del mismo donante fallecido; 2) trasplante de páncreas después del riñón; y 3) trasplante de páncreas solo para pacientes con diabetes tipo 1 que presentan hipoglucemia frecuente, manteniendo una función renal adecuada (Kerr et al., 2015).

Se ha demostrado que los pacientes que reciben un trasplante de páncreas y riñón tienen mejores ratios de supervivencia que los pacientes que únicamente reciben el trasplante de páncreas. De este modo, la combinación de trasplante de riñón y páncreas es más probable que sea exitoso (Venstrom et al., 2003). Por tanto, en la mayoría de los casos, el trasplante de páncreas se realiza en el contexto de pacientes con diabetes tipo 1 que sufren enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) (Venstrom et al., 2003).

Las limitaciones del trasplante de páncreas son la escasez de donantes y los efectos secundarios derivados del uso de fármacos inmunosupresores que son necesarios durante toda la vida de los pacientes (Venstrom et al., 2003).

4.4. Trasplante de islotes

El trasplante de islotes ha demostrado tener un beneficio terapéutico en pacientes con diabetes tipo 1, particularmente con el protocolo de Edmonton (Shapiro et al., 2006). Sin embargo, la escasez de donantes y las grandes cantidades de islotes funcionales necesarios en cada individuo para contrarrestar la diabetes han limitado la amplia aplicación clínica de este enfoque. Además, los procesos de aislamiento, purificación y trasplante de los islotes, junto con la respuesta inmune del huésped, deterioran en gran medida la función de los islotes y promueven su apoptosis, limitando la supervivencia a largo plazo de los injertos (Shapiro et al., 2006). Además, los pacientes requieren inmunosupresión de por vida añadiendo complicaciones derivadas de sus efectos secundarios. Por tanto, estas limitaciones indican que el trasplante de islotes no es una alternativa adecuada para los pacientes con diabetes tipo 1.

4.5. Terapia celular

Actualmente, también se están desarrollando a nivel experimental nuevas aproximaciones de terapia celular para la cura de la diabetes tipo 1, basadas en la utilización de células derivadas de células madre obtenidas de diferentes fuentes: células madre embrionarias (ESC), células madre hematopoyéticas derivadas de la médula ósea o células pluripotenciales inducidas (iPS). También se han utilizado células multipotentes derivadas del estroma mesenquimal, de la médula ósea, de sangre del cordón umbilical o del tejido adiposo, que se pueden diferenciar o reprogramar a células productoras de insulina (Chhabra and Brayman, 2013). Aunque los estudios basados en células madre embrionarias puedan ser prometedores, existen serias dudas sobre estos tipos de tratamientos, ya que no está claro si el sistema inmune de los pacientes atacaría estas células productoras de insulina, o tampoco se sabe si bastaría con un ciclo de infusión o si estas células a la larga presentarían tolerancia inmunológica (Thakkar et al., 2017).

Por tanto, actualmente no existe ninguna terapia que permita el control preciso a largo plazo de la glucemia en pacientes diabéticos, ni reducir el riesgo de aparición de complicaciones secundarias.

5. TERAPIA GÉNICA MEDIANTE VECTORES ADENOASOCIADOS

Las limitaciones de las terapias actuales para la diabetes tipo 1 podrían ser mejoradas con aproximaciones de terapia génica. La principal ventaja de la terapia génica es la posibilidad de obtener una corrección a largo plazo con una única administración de un vector terapéutico. En el caso de la diabetes tipo 1, esto permitiría evitar las múltiples inyecciones de insulina y las complicaciones asociadas a su dosificación.

Dentro de los diferentes vectores virales utilizados en terapia génica, destacan los vectores virales adenoasociados (AAV), que son derivados de virus *Parvoviridae*, genero *Dependovirus* modificados genéticamente en los cuales se han reemplazado todos los genes virales involucrados en los mecanismos de integración y de replicación, por el constructo con el gen terapéutico de interés (Nayerossadat et al., 2012). Consecuentemente, los vectores virales adenoasociados mantienen la infectividad del virus parental pero no son capaces de generar nuevos viriones.

Los AAVs no son patogénicos, presentan un perfil de seguridad excelente y la capacidad de proporcionar una expresión a largo plazo en una gran variedad de tejidos, características que los convierten en vehículos muy eficientes para la terapia génica (Mount et al., 2002).

Actualmente, existen gran número de ensayos clínicos en marcha con vectores AAV. En algunos ensayos clínicos, se ha demostrado expresión sostenida del transgén y la corrección de enfermedades como la deficiencia de proteína lipasa (Gaudet et al., 2012), hemofilia B, hemofilia A (High et al., 2014; Spencer et al., 2016) y dos formas de ceguera hereditables: La amaurosis congénita de Leber tipo 2 causada por mutaciones en el gen RPE65 (Bennett et al., 2016; Pierce and Bennett, 2015) y la neuropatía óptica hereditaria de Leber causada por mutaciones en el genoma mitocondrial (Feuer et al., 2016). Además, la agencia europea del medicamento aprobó la comercialización en 2012 de Glybera™, para el tratamiento de pacientes con hiperlipoproteinemia familiar, causada por una insuficiencia genética de la enzima lipoproteinlipasa.

Las reacciones adversas graves relacionadas con los tratamientos con AAV son raras, siendo más frecuentes reacciones adversas que implican la elevación de enzimas hepáticas y la respuesta inmune en células del hígado transducidas en casos donde se ha administrado una gran dosis intravenosamente. Esta respuesta inmune puede

contrarrestarse efectivamente mediante inmunosupresión transitoria (McIntosh et al., 2012).

5.1. Biología de los virus adenoasociados

Los AAVs dependen de las funciones de un virus auxiliar, adenovirus o un herpes simplex virus, para una eficiente replicación (Buller et al., 1981; Casto et al., 1967). Sin la presencia del virus auxiliar, los AAVs salvajes son retenidos en forma episomal formando grandes concatámeros circulares, o integrados en baja frecuencia dentro de una región específica del cromosoma humano 19 (19q13.3-qter) (McCarty et al., 2004).

El genoma de los virus AAVs consisten en una cadena simple de DNA (ssDNA) de aproximadamente 4.7 Kb. Este incluye las secuencias codificantes para las proteínas *Rep* y *Cap* flanqueadas por repeticiones terminales invertidas (ITRs) de 145 pares de bases (pb), que se comportan como el origen de replicación viral y la señal de empaquetamiento (**Fig. 5**) (Kotterman and Schaffer, 2014; Lisowski et al., 2015).

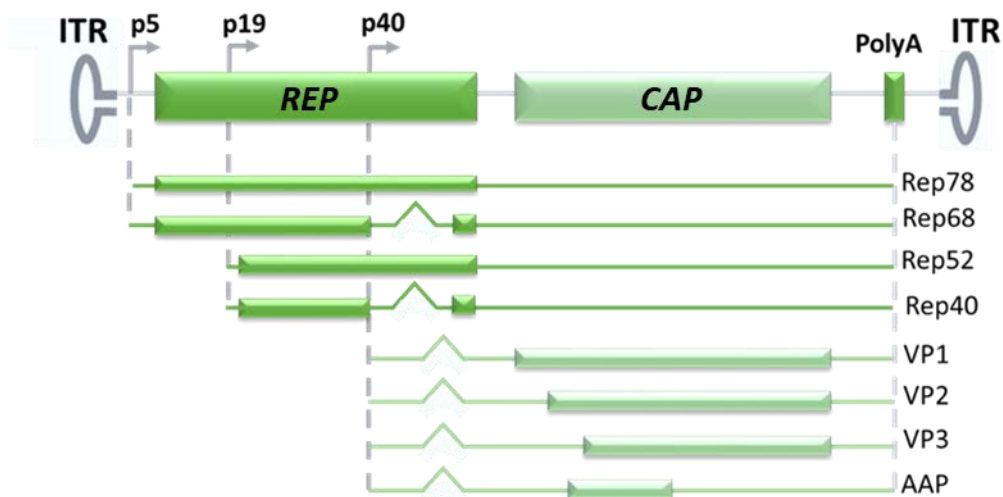


Figura 5. Genoma de los virus adenoasociados. Representación esquemática del genoma de DNA de cadena simple de un virus AAV, que contiene dos genes (*Rep* y *Cap*) con los tres marcos abiertos de lectura (ORF) flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITRs). Mediante el *splicing* alternativo, el ORF de *Rep* codifica por cuatro proteínas no estructurales (*REP78*, *REP68*, *REP52* y *REP40*) y el ORF de *Cap* codifica por tres proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 y la proteína de activación de ensamblaje (AAP). Rep78 y Rep68 son transcritos por el promotor interno p5, Rep52 y Rep40 por el promotor p19 y Cap por el promotor p40 (Adaptación de Balakrishnan et al., 2014).

El marco de lectura abierta (ORF) del gen *Rep* codifica para cuatro proteínas no estructurales (*REP78*, *REP68*, *REP52* y *REP40*), expresadas mediante promotores alternativos y variantes de *splicing*, las cuales son cruciales para la replicación, transcripción, integración y encapsidación del genoma (**Fig. 5**) (Kotterman and Schaffer, 2014). El ORF *Cap* codifica para tres proteínas estructurales de ensamblaje de la cápside (VP1, VP2 y VP3), que forman una cápside icosaédrica de 60 subunidades con la ayuda de la proteína de activación de ensamblaje (AAP), expresada a partir del ORF1 del gen *Cap* (Kotterman and Schaffer, 2014; Naumer et al., 2012) (**Fig. 5**).

5.2. Vectores AAV recombinantes

Para obtener vectores para aplicaciones de transferencia génica, se substituyen todos los ORFs del genoma viral por la secuencia de DNA heterólogo que contiene el constructo terapéutico de elección flanqueado por las ITRs. La partícula resultante se denomina vector AAV recombinante. El vector conserva la capacidad de empaquetamiento, pero es incapaz de replicarse (Hirata and Russell, 2000; Snyder et al., 2011). De esta manera, las células transducidas por los AAVs recombinantes no expresan ningún gen (Manno et al., 2006; Mingozzi and High, 2011)

Los vectores AAVs recombinantes se mantienen mayoritariamente en forma episomal en el núcleo de la célula huésped, aunque también puede integrarse en frecuencias muy bajas en el genoma, habitualmente en zonas de transcripción génica activa o en zonas donde se produce una rotura en la doble cadena de DNA (Deyle and Russell, 2009; Lisowski et al., 2015). Una vez se ha producido la transducción de la célula, los genomas de cadena simple de los AAVs recombinantes deben convertirse a doble cadena para ser transcritos y facilitar la expresión del transgén. La síntesis de la cadena complementaria requiere de la actividad de la célula huésped y es un paso limitante del proceso (Ferrari et al., 1996).

Se han diseñado también AAVs que contienen un genoma de doble cadena de DNA (dsAAV) para eludir el paso de la síntesis de la cadena complementaria y así mejorar la producción de la proteína terapéutica (McCarty et al., 2001). No obstante, los dsAAV presentan una capacidad de clonaje más limitada y una mayor dificultad en su obtención. Además, la respuesta innata del sistema inmune contra estos vectores es superior a la de los vectores AAV de cadena única (Martino et al., 2011).

La producción y purificación de los vectores AAV recombinante se puede conseguir en el laboratorio a títulos elevados (Ayuso et al., 2010a). Para evitar posibles recombinaciones durante la producción de los vectores, los sistemas de empaquetamiento acostumbran a expresar las proteínas virales en *trans* con el gen terapéutico (Snyder et al., 2011).

El sistema más utilizado para producir vectores AAV recombinantes consiste en la cotransfección de las células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) con tres plásmidos (**Fig. 6**). Uno de los plásmidos contiene el constructo terapéutico flanqueado generalmente por las dos ITRs del AAV de serotipo 2, dado que es el serotipo mejor caracterizado (Samulski et al., 1982; Srivastava et al., 1983). El segundo plásmido aporta los genes *Rep* y *Cap* del genoma del AAV sin las ITRs. Por último, el tercer plásmido aporta las funciones adenovirales necesarias para la replicación de los AAVs. Después de la expresión y transducción de las proteínas *REP* y *VP*, el constructo terapéutico flanqueado por las ITRs es replicado y las moléculas de DNA monocadena son introducidas en las cápsidas del AAV (**Fig. 6**).

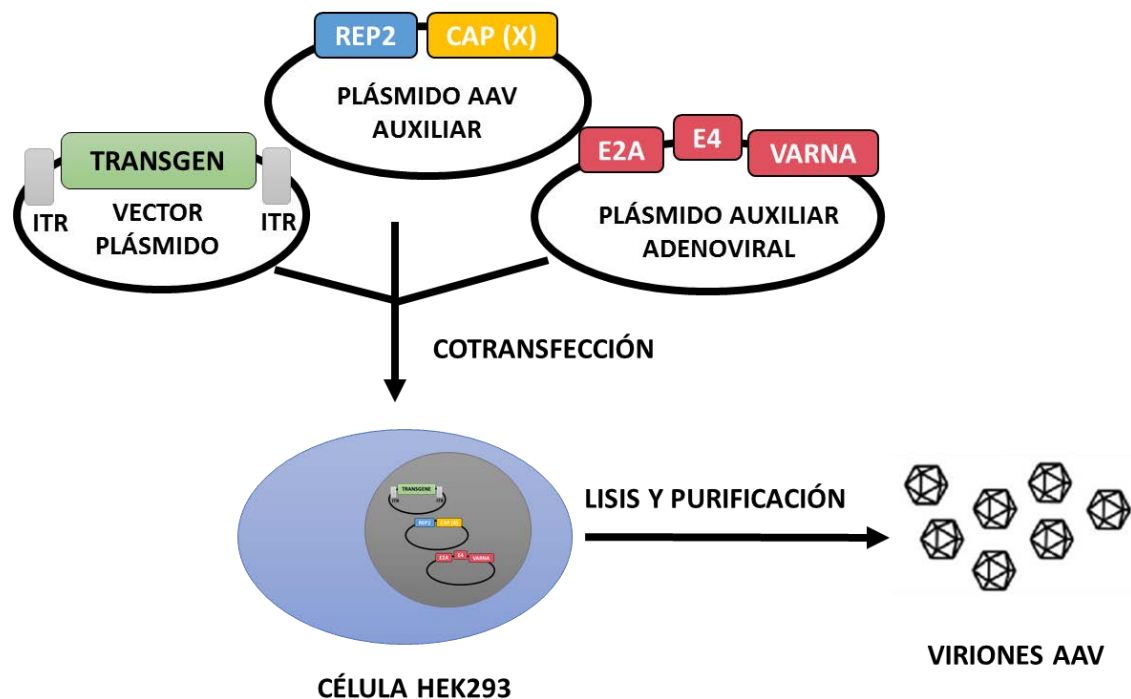


Figura 6. Producción de AAV recombinantes mediante triple transfección. Para la producción de AAV recombinantes, los ORFs virales son reemplazados por el transgén flanqueado por las señales de empaquetamiento virales (ITRs). Las proteínas virales de los genes *Rep* y *Cap* son aportadas en *trans* del plásmido *helper*. Las funciones del virus auxiliar son proporcionadas mediante la transfección de un tercer plásmido que codifica para los genes adenovirales necesarios para la producción de los AAV. Posteriormente, las partículas víricas son purificadas a partir del lisado celular para obtener el mayor número de partículas AAV con genoma encapsidado. La representación esquemática no está hecha a escala. (Adaptada de Ayuso et al., 210b).

A continuación, las partículas víricas se obtienen por purificación del lisado celular y del medio de cultivo por centrifugación en un gradiente de densidad (CsCl o iodixanol) y/o por cromatografía en columna. Las preparaciones del vector purificado también pueden contener cápsides vacías, la cantidad de las cuales depende de la eficacia de empaquetamiento y del método de purificación (Ayuso et al., 2010b). El método de purificación que separa más eficientemente las cápsides vacías de las cápsides con genoma encapsidado es la purificación mediante un doble gradiente de CsCl (Ayuso et al., 2010b; Scallan et al., 2006; Zolotukhin et al., 1999). En particular, la precipitación con polietilenglicol (PEG) y el protocolo de purificación con CsCl reducen significativamente las cápsides vacías de los vectores AAVs y las impurezas de DNA y proteína, aumentando así la pureza de la preparación viral, lo que en último término resulta en una mayor transducción *in vivo* (Ayuso et al., 2010b).

La Tabla 3 describe los principales serotipos de AAVs utilizados en terapia génica. Estos serotipos se diferencian por las secuencias que codifican las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3), que determinan la afinidad de unión con los diferentes receptores y co-receptores celulares, confiriendo a cada serotipo diferente tropismo tisular (Balakrishnan and Jayandharan, 2014).

Tabla 3. Características de los serotipos de AAV del 1 al 10. Resumen del origen de cada serotipo de AAV, sus receptores y su tropismo celular.

Serotipo	Origen	Receptor y co-receptor	Tropismo tisular
AAV1	Humano o NHP	N-linked sialic acid	MS ^{1,2,3} , SNC ^{1,2} , vías aéreas ^{1,2} , retina ¹ , páncreas ¹ , corazón ^{1,4} , hígado ¹
AAV2	Humano	HSPG, FGFR1, HGFR, LamR, CD9, integrina $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$	MS ¹ , SNC ^{1,5} , hígado ¹ , riñón ¹ , retina ^{1,2,3,6}
AAV3	Humano NHP	HSPG, FGFR, HGFR, LamR	HCC ⁶ , MS ¹ , oído interno, hígado ⁵
AAV4	NHP	O-linked sialic acid	SNC ¹ , retina ^{1,3} , pulmón ^{1,2} , riñón ¹
AAV5	Humano	N-linked sialic acid, PDGFR	MS ¹ , SNC ^{1,3} , pulmón ¹ , retina ¹ , fetege
AAV6	Humano	HSPG, N-linked sialic acid	MS ^{1,3} , corazón ^{1,3,4,7} , páncreas ¹ , vías respiratorias ^{1,2,3}
AAV7	Rhesus macaque	Desconocido	MS ¹ , retina ¹ , SNC ¹ , hígado ¹
AAV8	Rhesus macaque	LamR	Hígado ^{1,2,3} , SNC ^{1,2,3} , retina ^{1,3} , corazón ¹ , MS ¹ , páncreas ¹ , riñón ¹ , tejido adiposo ¹
AAV9	Humano	N-linked glycans, LamR	Hígado ¹ , corazón ^{1,2,4} , MS ^{1,3} , pulmón ¹ , páncreas ¹ , SNC ^{1,2} , retina ^{1,2} , testículos ¹ , riñón ¹ , tejido adiposo ¹
AAV10	NHP	Desconegut	Hígado
AAVrh10	Rhesus macaque	LamR	Hígado ¹ , corazón ¹ , MS ^{1,3} , riñón ¹ , SNC ^{1,8} , páncreas ¹ , retina ¹

Tropismo tisular en ¹ratón, ²NHP, ³perro, ⁴cerdo, ⁵mono, ⁶ser humano, ⁷oveja y ⁸rata.

Abreviaciones: NHP, *non-human primate*; HSPG, *heparan sulfate proteoglycan*; LamR, 37/67 kDa *laminin receptor*; FGFR1, *fibroblast growth factor receptor1*; HGFR, *hepatocyte growth factor receptor*; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; MS, músculo esquelético; SNC, Sistema nervioso central; HCC, *hepatocellular carcinoma*. Adaptación de (Balakrishnan and Jayandharan, 2014; Jimenez et al., 2013; Lisowski et al., 2015)

6. TERAPIA GÉNICA MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE VECTORES AAV-INS Y DE AAV-GCK

Actualmente, se han puesto en marcha diferentes estrategias de terapia génica para tratar la diabetes tipo 1, que pueden ser divididas en tres categorías: 1) El tratamiento preventivo, en el que se aborda la patogénesis autoinmune para evitar la destrucción de las células β remanentes o para mejorar la supervivencia de las células trasplantadas; 2) La neogénesis y regeneración de las células β residentes en el páncreas, en el que los genes o factores claves son introducidos en las células β remanentes, en precursores de células β , en el páncreas exocrino o en tejidos extra pancreáticos; 3) La mejora de la captación de la glucosa mediante la manipulación de tejidos extrapancreáticos.

En nuestro laboratorio, nos hemos centrado en la transferencia de los genes de la insulina y la glucoquinasa a músculo esquelético a fin de conseguir la producción y secreción de niveles basales de insulina e incrementar la captación de glucosa en el músculo esquelético para revertir la hiperglucemia diabética. Así, hemos desarrollado una aproximación de terapia génica en la que generamos un “sensor de glucosa” en dicho músculo esquelético, mediante la expresión de estos dos genes en dicho tejido mediante el uso de vectores adenoasociados de serotipo 1 (AAV1).

El músculo esquelético es un buen candidato para la manipulación genética para tratar la diabetes porque constituye un tejido grande y bien irrigado, fácilmente accesible mediante procedimientos no invasivos, presenta una gran cantidad de receptores de insulina y es el lugar más importante para la captación de glucosa tras la ingesta (Lamothe et al., 1998; Mingozi and High, 2011; Rao et al., 1996; Whites and Kahn, 1994). Además, puede ser transducido muy eficientemente por vectores AAV1, tiene la capacidad de secretar eficazmente proteínas recombinantes al torrente sanguíneo.

También, debido a su limitada capacidad de proliferación, la expresión del transgén se mantiene durante muchos años y los riesgos de sufrir mutaciones por inserción de los vectores AAV son bajos. Otra consideración importante es que la administración intramuscular de los genes terapéuticos mediante vectores AAV no se ve limitada por la presencia de anticuerpos neutralizantes preexistentes y la administración de los vectores en la musculatura esquelética conlleva una mínima biodistribución sistémica reduciendo así la genotoxicidad de los vectores (Kay, 2011; Manno et al., 2003; Mingozi and High,

2011). Se han realizado varios estudios clínicos con éxito en que se han administrado vectores AAV1 a músculo esquelético, tales como la terapia génica para contrarrestar la deficiencia de alfa-1 antitripsina (Flotte et al., 2011), o para el tratamiento de la distrofia muscular Limb-Girdle tipo 2 (Mendell et al., 2009). Además, cabe destacar que el primer tratamiento de terapia génica aprobado para su comercialización por la Agencia Europea del Medicamento, el Glibera®, se trata de un vector AAV1 que se administra intramuscularmente para expresar la lipoprotein lipasa.

6.1. Antecedentes: producción de insulina mediante la modificación genética del músculo esquelético

Los primeros estudios realizados, a fin de producir insulina por tejidos extrapancreáticos, mostraron una mejora de la hiperglucemia mediante la implantación de fibroblastos transfectados con proinsulina en ratones diabéticos (Selden et al., 1987). Sin embargo, existen algunas limitaciones, porque solo las células β tienen las proteasas necesarias para el procesamiento de la proinsulina en insulina madura eliminando el Péptido C. Para resolver esta limitación, el gen de la proinsulina se modificó para poder ser procesado por otras proteasas, como la endoproteasa furina que se expresa en el músculo esquelético. Esta endoproteasa reconoce una secuencia de cuatro aminoácidos que se puede introducir en el sitio de unión entre el péptido C y las cadenas A y B de la proinsulina mediante manipulación genética (Groskreutz et al., 1994; Simonson et al., 1996).

En nuestro laboratorio, se generaron ratones transgénicos que expresan el gen de la insulina humana conteniendo las señales de conocimiento para furina, bajo el control del promotor de músculo esquelético *myosin light chain* (MLC). Cuando se les indujo diabetes experimental mediante administración de estreptozotocina (STZ), los ratones transgénicos mostraron normoglucemia, normoinsulinemia en ayunas, redujeron la hiperglucemia y aumentaron los niveles de insulinemia en condiciones de alimentación. Además, la inyección de dosis muy bajas de insulina exógena restauró completamente la glucemia en alimentación. Estos estudios indicaron que el músculo esquelético puede ser un tejido diana clave para la producción de insulina y sugiere que las células musculares pueden secretar niveles basales de insulina, lo cual, junto con una terapia exógena con insulina, permitía una regulación estricta de la glucemia (Riu et al., 2002).

También, se observó en roedores diabéticos, que la administración mediante electrotransferencia al músculo esquelético de un plásmido que codificaba el gen de la insulina, era capaz de controlar la hiperglucemia en ayunas (Croze and Prud'homme, 2003; Shaw et al., 2002; Yin and Tang, 2001).

6.2. Antecedentes: Expresión de glucoquinasa en músculo esquelético

La glucoquinasa (Gck), también llamada hexoquinasa IV, es una enzima que facilita la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato. La Gck se expresa en el hígado, el páncreas, en células neuroendocrinas del intestino y en el hipotálamo en seres humanos y en la mayoría de los otros vertebrados (Matschinsky et al., 2006). En cada uno de estos órganos la Gck desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono actuando como un sensor de glucosa y provocando cambios en el metabolismo o en la función celular en respuesta a niveles crecientes o decrecientes de glucosa circulante.

A diferencia del resto de hexoquinasas, la Gck posee dos propiedades cinéticas importantes: 1) presenta una *km* alta (menor afinidad) para la glucosa (5-8mM). Además, presenta también una competitividad positiva con la glucosa de manera que la Gck cambia de conformación y es cada vez más activa en paralelo con el aumento de la concentración de glucosa en el rango fisiológico de 4-10 mmol/L (72-180 mg/dl) (Bell et al., 1996; Matschinsky, 1996); 2) su actividad no es inhibida por su producto, la glucosa-6-fosfato a concentraciones fisiológicas (Bell et al., 1996; Iynedjian, 1993; Printz et al., 1993). Estas características confieren a la Gck una mayor capacidad de fosforilación de la glucosa a altas concentraciones del azúcar y así controlar la captación de glucosa en relación con los niveles de glucosa circulantes (Matschinsky, 1996; Matschinsky et al., 2006; Printz et al., 1993).

En nuestro laboratorio, se generaron ratones transgénicos que expresaban Gck bajo el control del promotor de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), específico de hepatocitos, para estudiar si la sobreexpresión de Gck en el hígado de ratones diabéticos podría prevenir alteraciones metabólicas. Al contrario de los ratones control diabéticos, los ratones transgénicos diabéticos presentaban una fuerte reducción de la hiperglucemia y una normalización de los triglicéridos, de los ácidos grasos libres y de los cuerpos

cetónicos circulantes, grasos libres (Ferre et al., 1996). Otro grupo también mostró que la sobreexpresión de Gck en hígado mediante un adenovirus combinada con inyecciones subcutáneas de insulina en ratas diabéticas proporcionaban un mejor control glucémico que el tratamiento con insulina exógena (Morral et al., 2002). Sin embargo, la sobreexpresión a largo plazo de Gck en el hígado de ratones transgénicos resultó en hiperglucemia, intolerancia progresiva a la glucosa, hiperinsulinemia, esteatosis hepática y aumento de los niveles de triglicéridos circulantes. Por tanto, la sobreexpresión de Gck en hígado puede tener efectos perjudiciales a largo plazo, debido al incremento crónico en la captación de glucosa, que dependen del nivel y la duración del incremento en la actividad Gck (Ferre et al., 2003; Morral et al., 2002).

Por este motivo, el músculo esquelético se consideró como tejido alternativo para la expresión de Gck. En nuestro laboratorio, se generaron ratones transgénicos que expresaban Gck en el músculo esquelético mediante el promotor específico MLC. Los ratones transgénicos sanos mostraron una disminución de la glucemia en alimentación y en ayuno, unos niveles de insulinemia menores y una mayor captación de glucosa de la sangre después de una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. Cuando se indujo la diabetes a estos ratones transgénicos, se observó una reducción parcial de la hiperglucemia y el mantenimiento del peso corporal (Otaegui et al., 2000). La expresión de Gck en ratones transgénicos diabéticos, resultó en un mayor contenido de glucosa-6-fosfato y en un incremento de captación de glucosa probablemente debido a un aumento del transporte de glucosa no insulino dependiente, lo cual explicaría la mejoría parcial de la hiperglucemia (Otaegui et al., 2000). Además, los ratones transgénicos tuvieron una respuesta hipoglucémica más rápida tras la administración de insulina exógena, en comparación con los ratones control diabéticos, indicando que los ratones transgénicos eran más sensibles a la insulina (Otaegui et al., 2000). En otro estudio de nuestro laboratorio, células diferenciadas a mioblasto que expresaban Gck mostraron un aumento de la captación de glucosa *in vitro* (Otaegui et al., 2002). Cuando estos mioblastos se trasplantaron en ratones diabéticos, se observó una reducción en la hiperglucemia en comparación con los ratones diabéticos control (Otaegui et al., 2002). Por tanto, todos estos estudios demostraron la capacidad de la sobreexpresión de Gck en músculo esquelético de aumentar la captación de glucosa por este tejido.

6.3. Reversión de la diabetes tipo 1 mediante la generación de un sensor de glucosa en el músculo esquelético

Dado que tanto la expresión de insulina como la de la Gck llevaba a una mejora de la hiperglucemia diabética, se decidió estudiar el efecto de la sobreexpresión conjunta de ambos genes en el músculo esquelético.

Así, en nuestro laboratorio se generaron ratones transgénicos dobles que expresaban a la vez insulina y glucoquinasa en el músculo esquelético. Estos ratones transgénicos eran capaces de prevenir el desarrollo de la hiperglucemia diabética, tanto en condiciones de alimentación como en ayuno, así como las alteraciones metabólicas cuando se les indujo la diabetes mediante tratamiento con STZ (Mas et al., 2006). Este estudio demostró la acción sinérgica entre la insulina producida constitutivamente a niveles basales y el aumento de la captación y fosforilación de glucosa por la Gck. Además, los animales transgénicos diabéticos no mostraron hipoglucemia después de un ayuno. Asimismo, al contrario de los ratones controles diabéticos que tenían niveles muy bajos de insulina circulante, los ratones transgénicos tratados con STZ mostraron un aumento de la insulinemia. Esto, resultó en un incremento de la actividad de Gck en el hígado y a una disminución de la expresión de la PEPCCK en este tejido de ratones transgénicos. Todo ello llevaba a un aumento en la captación de glucosa ya una disminución de producción de glucosa por el hígado, contribuyendo así al mantenimiento de la normoglucemia. También, se observó que los ratones transgénicos diabéticos presentaron niveles de glucógeno en hígado y músculo similares a los de los ratones controles sanos (Mas et al., 2006).

Estos resultados sugirieron que se podría desarrollar una aproximación de terapia génica, utilizando vectores virales AAV para transferir los genes de la insulina y la Gck para el tratamiento de la diabetes tipo 1. Con este fin, se inyectaron los vectores AAV1-Ins y AAV1-Gck por vía intramuscular en los músculos *tibialis cranialis*, *gastrocnemius* y *quadriceps femoris* de ambas extremidades posteriores de ratones diabéticos. Ambos genes se expresaron bajo el control del promotor CMV. Los ratones tratados mostraron una normalización de la glucemia en condiciones de alimentación y en ayuno, durante más de 4 meses después del tratamiento (Mas et al., 2006). Por el contrario, ratones diabéticos tratados únicamente con AAV1-Ins solo normalizaron la hiperglucemia en ayunas, pero no en condiciones de alimentación. Además, los ratones tratados con AAV1-Ins y AAV1-Gck mostraron una normalización de los parámetros metabólicos, de la tolerancia a la glucosa

y de la ingesta de alimentos y líquidos. Por tanto, la acción conjunta de la producción basal de insulina y la actividad Gck generó un “sensor de glucosa” en el músculo esquelético que permitió una regulación eficiente de la glucemia en ratones diabéticos (Mas et al., 2006) (Fig. 7).

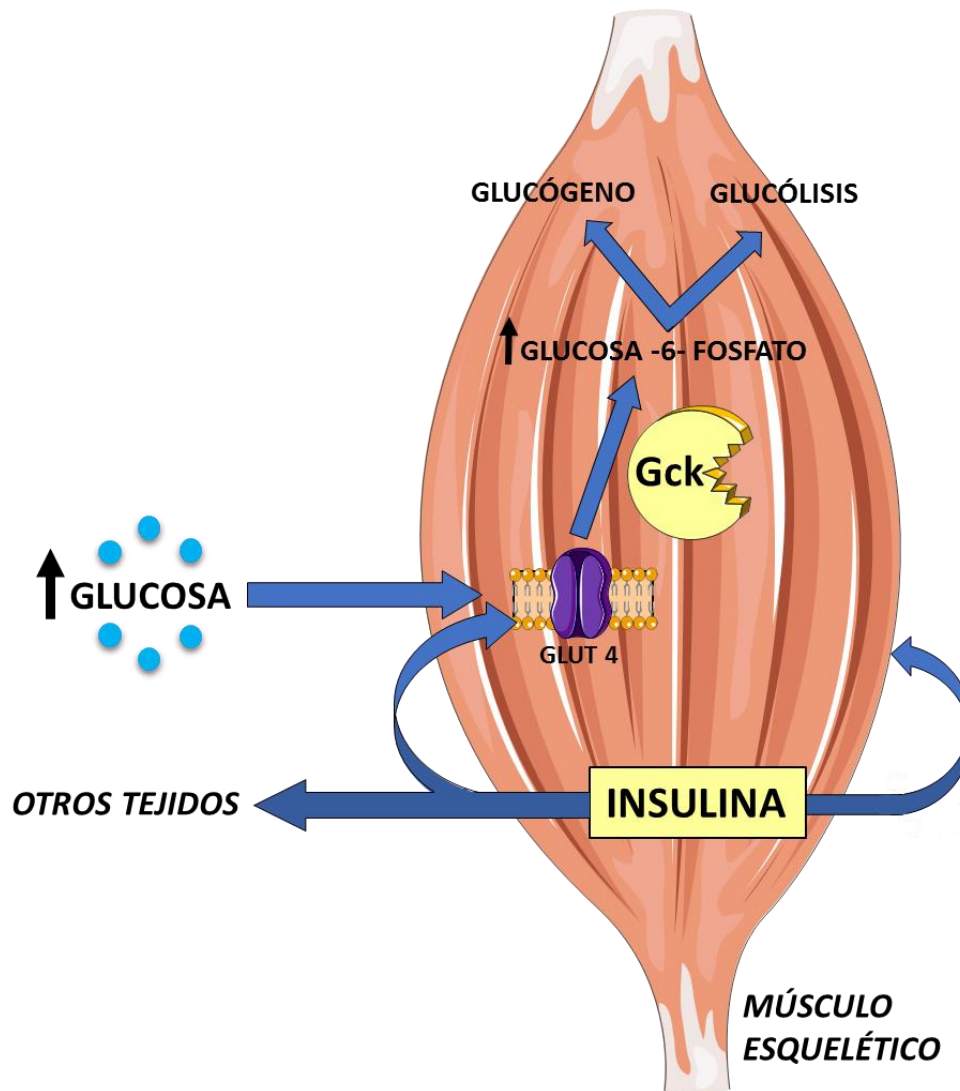


Figura 7. Sensor de glucosa en el músculo esquelético. La expresión constante de bajos niveles de insulina asegura la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y junto a la expresión de Gck hace que el músculo esquelético capte glucosa solo cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados, previniendo así la hipoglucemia. Asimismo, estos bajos niveles de insulina son suficientes para inhibir la lipólisis y prevenir cetoacidosis.

6.4. Reversión de la diabetes tipo 1 en perros mediante la generación de un sensor de la glucosa en el músculo esquelético

El siguiente paso hacia el desarrollo clínico de esta terapia era evaluar la viabilidad de este abordaje en un modelo animal grande. La selección del perro como modelo animal grande para el estudio de la diabetes tipo 1 se basó en el hecho de que ha sido ampliamente estudiado a lo largo de la historia de la investigación de la diabetes. Los perros jugaron un papel importante en la investigación sobre el tratamiento de la diabetes con el descubrimiento en 1922 de la insulina por Banting y Best, que permitió corregir la hiperglucemia en perros usando extractos pancreáticos (Banting et al., 1922).

En nuestro laboratorio, se estableció un nuevo método para la administración intramuscular de los vectores AAV, centrado en la utilización de un disco multi-inyector con cinco agujas conectado a una jeringa, para así distribuir el vector de forma fácil a mayores áreas musculares. Usando estos discos multi-inyectores se trató un perro con vectores AAV que contenían el gen de la proteína marcadora GFP y se observó tras el análisis inmunohistoquímico una gran distribución de GFP por toda la masa muscular (Callejas et al., 2013).

Posteriormente, se puso en marcha un estudio preclínico en perros diabéticos para investigar la eficacia, la duración del efecto terapéutico y la seguridad de esta aproximación en animales grandes diabéticos. En primer lugar, se indujo la diabetes perros Beagle mediante la administración de una mezcla de STZ y aloxana. Los perros diabéticos se trataron posteriormente con vectores AAV1-Ins y AAV1-GCk (Callejas et al., 2013). Tras el tratamiento, se observó una normalización de la glucemia en ayunas y una mejor tolerancia a la glucosa tras la administración oral de un bolo de glucosa. Durante los 4 años tras la transferencia génica, los animales no mostraron episodios de hipoglucemia. Esta normalización del metabolismo de la glucosa se asoció con la recuperación del peso corporal, la normalización de las proteínas plasmáticas glucosiladas (fructosamina) y la supervivencia a largo plazo sin complicaciones secundarias. Por otro lado, en este estudio también se comprobó que la administración únicamente de la insulina exógena o que el tratamiento individual con AAV1-Ins o con AAV1-Gck en perros diabéticos eran incapaces de contrarrestar la diabetes (Callejas et al., 2013). Por tanto, este estudio indicó claramente que la acción sinérgica de la insulina y la glucoquinasa eran necesarias para contrarrestar la diabetes.

Esta demostración de la corrección a largo plazo de la hiperglucemia diabética en perros Beagle diabéticos, proporcionó la primera prueba de concepto en un modelo animal grande para el enfoque de la transferencia de AAV1-Ins y AAV1-Gck para tratar la diabetes tipo 1 y establecer las bases para la futura translación de esta terapia a la clínica.

III. OBJETIVOS

En nuestro laboratorio se ha demostrado previamente que la manipulación del músculo esquelético mediante la administración de dos vectores AAV que codifican para insulina y glucocinasa (AAV-Ins y AAV-Gck) permite contrarrestar el proceso diabético en perros Beagle. Para la futura translación clínica de esta estrategia de terapia génica para la diabetes, es necesaria la evaluación a largo plazo de este tratamiento para determinar la seguridad y eficacia terapéutica del mismo a medida que los individuos envejecen. Asimismo, se requiere realizar optimizaciones tales como la generación de un vector AAV único que codifique conjuntamente para ambos genes.

Por tanto, el objetivo de este trabajo experimental fue **evaluar la seguridad y eficacia terapéutica a largo plazo del tratamiento con vectores AAV-Ins y AAV-Gck en perros diabéticos y desarrollar un nuevo vector dual que permita la expresión conjunta de ambos genes terapéuticos**. Este objetivo se divide en los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un seguimiento de la seguridad y eficacia a más largo plazo (de los 4 a los 8 años tras el tratamiento) de los perros diabéticos tratados previamente con AAV-Ins y AAV-Gck.
2. Diseñar y producir nuevos vectores duales que permitan la expresión conjunta de insulina y de glucoquinasa, como un paso previo a la transferencia futura de esta aproximación a pacientes diabéticos.

IV. RESULTADOS

Parte 1: Eficacia y seguridad a largo plazo de la terapia génica para diabetes tipo 1 con insulina y glucoquinasa

1. CONTROL GLUCÉMICO EN PERROS TRATADOS CON AAV1-INS y AAV1-GCK

Previamente en nuestro laboratorio habíamos demostrado que la diabetes tipo 1 podía ser tratada en perros con una terapia génica basada en la generación de un sensor de glucosa en el músculo esquelético gracias a la expresión del gen de la insulina y el de la glucoquinasa (Callejas et al., 2013). A dos perros diabéticos (Dog 1 y Dog 2) que se trataron con una dosis de 1×10^{12} vg/Kg de AAV1-Ins y de AAV1-Gck, mostraron corrección de la enfermedad y se les hizo un seguimiento durante los primeros 4 años. Con el fin de evaluar la eficacia y la seguridad de nuestro tratamiento a más largo plazo, se realizó el seguimiento durante los 4 años posteriores, es decir hasta los 8 años después de la administración de los vectores de terapia génica a estos dos perros tratados en el previo estudio.

Durante este periodo de seguimiento, se evaluó la eficacia del tratamiento y se realizó periódicamente un control del estado de salud de los animales. Con el fin de evaluar la eficacia a largo plazo del tratamiento se monitorizaron semanalmente los niveles de glucemia en ayuno y de peso de los animales a las 9 de la mañana. También, se obtuvieron muestras de sangre regularmente para poder obtener suero y así poder determinar los niveles de insulina. Además, para asegurar que los animales presentaban un buen estado de salud, mensualmente se analizaron diferentes parámetros bioquímicos y trimestralmente se les realizó análisis hematológicos. Puesto que una de las complicaciones secundarias más frecuentes en perros diabéticos son las cataratas, se les realizaron a los animales exámenes oftalmológicos regularmente durante el periodo de seguimiento.

Durante todo el periodo de estudio, como ya se observó en los primeros cuatro años de seguimiento, los animales tratados con AAV1-Ins+Gck presentaban normoglucesmia en ayuno con pequeñas oscilaciones que siempre se mantenían dentro del rango de normalidad (Nelson, 2010) (**Fig. 8a,b**). La evolución del peso de los animales fue la que se esperaría en animales sanos (**Fig. 8c,d**). Los perros sobrevivieron hasta el día de sacrificio sin la necesidad de tratamiento con insulina exógena. Al analizar los niveles de insulina circulante se observó que los animales inyectados con *vectores AAV1* tuvieron niveles de insulina sérica similares a los observados durante los primeros años del tratamiento (Callejas et al., 2013). El análisis de los niveles de insulina circulante hasta los 8 años después del tratamiento eran muy similares en ambos perros y se mantenían dentro del

rango observado en animales sanos en ayuno en todos los puntos analizados, demostrando una producción de proteína terapéutica a niveles bajos constantes durante todo el estudio (Fig. 8e,f).

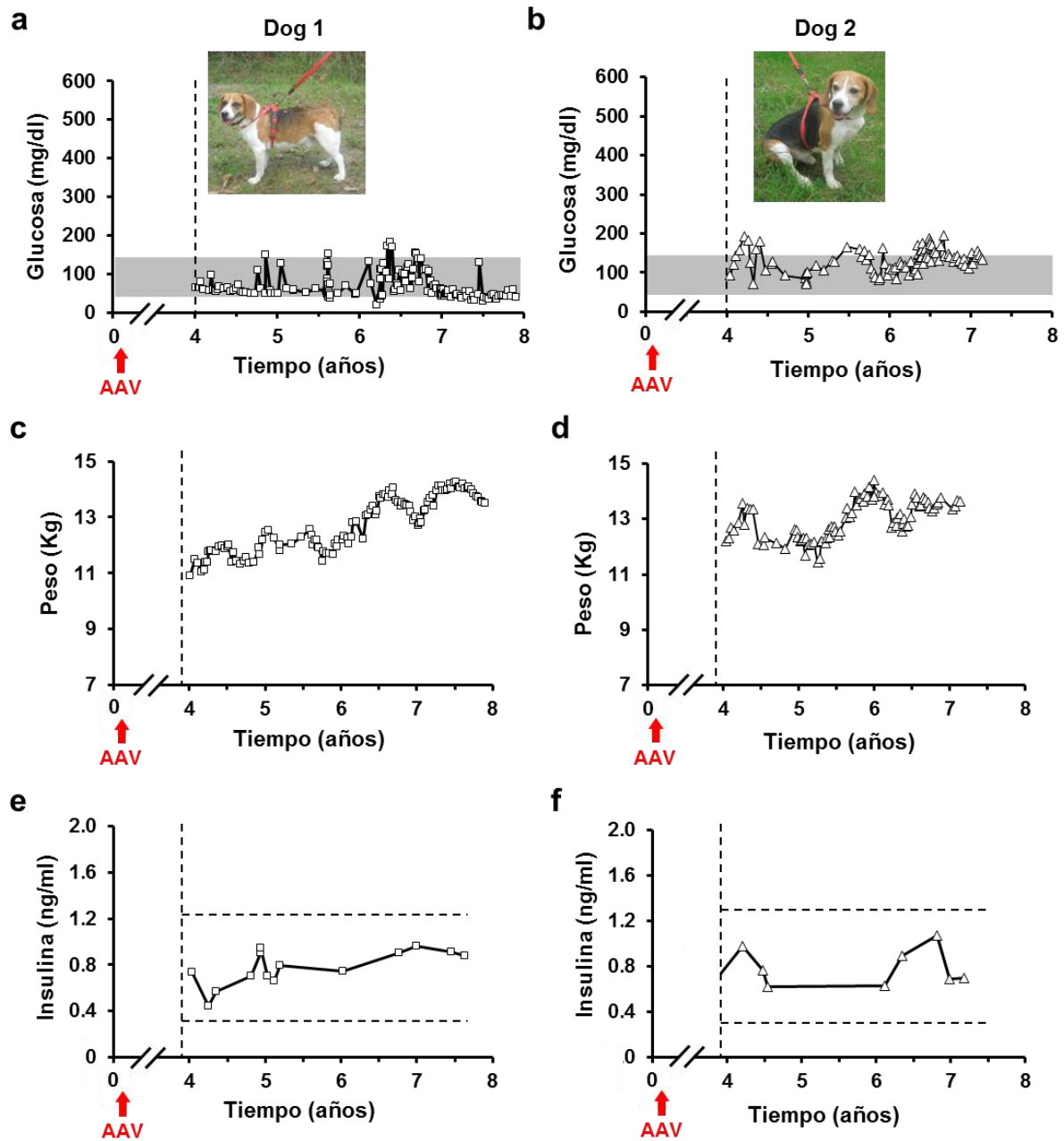


Figura 8. Corrección de la diabetes durante 8 años en perros que recibieron un único tratamiento con AAV1-Ins+Gck. (a,b) El seguimiento de la glucemia, (c,d) peso corporal y (e,f) la insulinemia en los perros diabéticos Dog 1 y Dog 2 tratados con vectores AAV1-Ins y AAV1-Gck a una dosis de 1×10^{12} vg/kg cada uno. En las figuras se representa el resultado del seguimiento de los animales desde los 4 años hasta los 8 años después de la transferencia génica. El punto 0 indica el momento de la inducción de la diabetes (Callejas et al., 2013). Las flechas rojas indican el momento de la administración de los vectores AAV. Las barras grises indican el rango de normogluceemia en perros sanos en ayuno (Nelson, 2010). La insulina se mantuvo dentro del rango de perros sanos en ayuno (líneas discontinuas) en ambos perros diabéticos tratados con AAV1 durante todo el periodo de seguimiento.

Con la finalidad de demostrar que la insulina circulante durante todo el periodo de seguimiento era producida por las células musculares inyectadas con AAV1-Ins + AAV1-Gck y no era procedente del páncreas de los animales, se realizó un análisis morfológico del páncreas y se determinó la presencia de células β por área de páncreas.

Al cuantificar las células β se verificó que los animales presentaron una reducción de más del 95% del área de células β /área de páncreas en ambos perros. Este resultado ha demostrado la ausencia de insulina producida por el páncreas en ambos perros después de más de 8 años de la inducción de la diabetes (**Fig. 9a**). Además, para comprobar que la insulina detectada era insulina humana, producida por el músculo esquelético, se realizó un análisis por RIA de los niveles de péptido C humano. En la **Fig. 9b**, se representan los niveles de péptido C en los perros tratados con AAV1- Ins + AAV1-Gck mientras que no se podían detectar la presencia de dicho péptido estos niveles en los animales control sanos. Esta prueba, que es específica para el péptido C humano, permitía demostrar con fiabilidad que la insulina circulante detectada era insulina humana y no canina.

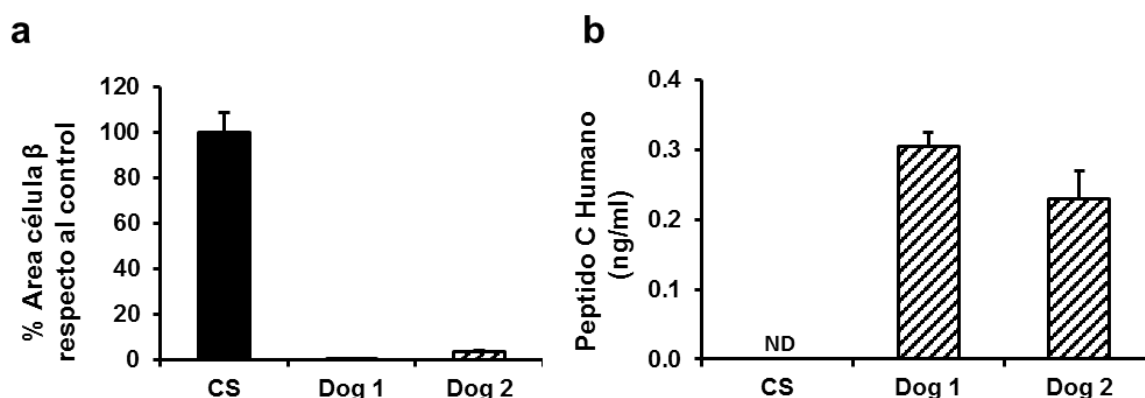


Figura 9. Evaluación del área de célula β y de los niveles de péptido C humano. (a) Cuantificación del área de célula β en páncreas de perro control sano, en Dog 1 y Dog 2 se obtuvieron al finalizar el estudio (4 secciones de 2-4 regiones pancreáticas diferentes). (b) Niveles en suero de péptido C humano en perros control sanos (CS) y en Dog 1 y Dog 2. La detección de péptido C humano en perros diabéticos tratados con AAV1-Ins+Gck demuestra que la proinsulina fue producida y procesada en el músculo esquelético.

2. CORRECCIÓN METABÓLICA DE LA DIABETES MEDIANTE TERAPIA GÉNICA MEDIANTE TRATAMIENTO CON AAV1-INS + AAV1-GCK

La fructosamina es el principal parámetro bioquímico que se utiliza para valorar el control glucémico en perros. La fructosamina es el producto de la glucosilación no enzimática de proteínas séricas. La extensión en que las proteínas séricas son glucosiladas guarda relación directa con la concentración sanguínea de glucosa: a mayores concentraciones de fructosamina, más pobre es el control glucémico (Nelson, 2010). Por tanto, la concentración sérica de fructosamina es un buen indicador de la concentración de glucosa promedio durante las 2-3 semanas precedentes.

Durante todo el periodo de seguimiento, los niveles de fructosamina en el suero de los dos perros diabéticos tratados con AAV1-Ins + AAV1-Gck se encontraron en un rango entre 240-350 $\mu\text{mol/L}$ (**Fig. 10**). Estos valores estaban por debajo del límite superior del que se considera un buen control glucémico en Medicina Veterinaria (450 $\mu\text{mol/L}$) (Davison et al., 2005). En los perros controles diabéticos es generalmente difícil de conseguir estos valores incluso mediante múltiples administraciones de insulina exógena (Callejas et al., 2013; Davison et al., 2005; Fracassi et al., 2012).

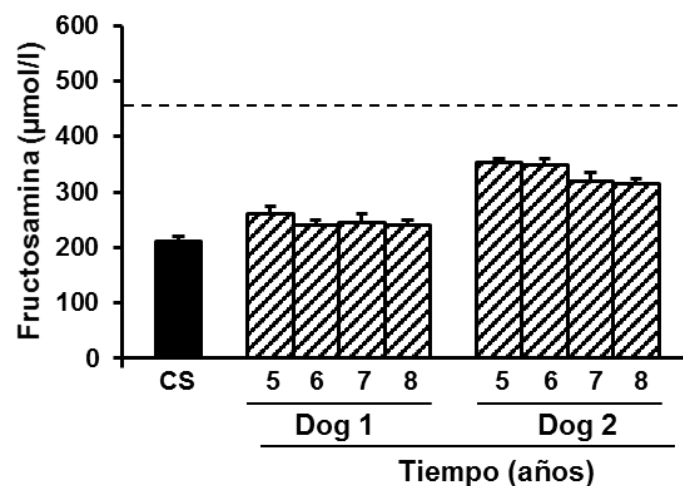


Figura 10. Niveles de fructosamina. Seguimiento de los niveles en suero de fructosamina en el Dog 1 y el Dog 2. Cada barra representa la media \pm EEM de 5-12 determinaciones realizadas cada año post tratamiento (del año 5 al 8). La media de los valores de fructosamina medidos en 4 perros sanos control (Cs) de edad similar (8-11 años de edad) se indican como referencia. La línea discontinua indica el límite considerado como buen control glucémico en Medicina Veterinaria (Nelson, 2010).

Para comprobar que tras 8 años de seguimiento los dos animales mantenían la capacidad de responder a una sobrecarga de glucosa, se les realizó a los perros tratados un test oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). En respuesta a una sobrecarga de azúcar, los perros tratados con Ins+Gck mostraron solo un pequeño incremento en los niveles de glucosa en sangre comparado con los perros sanos de edad similar y rápidamente volvían a presentar valores de normoglucesmia (**Fig. 11**). Además, dos horas después de la administración de glucosa, la glucemia de ambos perros fue menor de 200 mg/dl, respuesta que se considera como no diabética por la directriz de la “*American Diabetes Association guidelines*” (2h-glucosa plasma <200 mg/dl).

Este resultado permitía demostrar que el sistema insulina-glucoquinasa se mantenía funcional trascurridos 8 años desde el tratamiento.

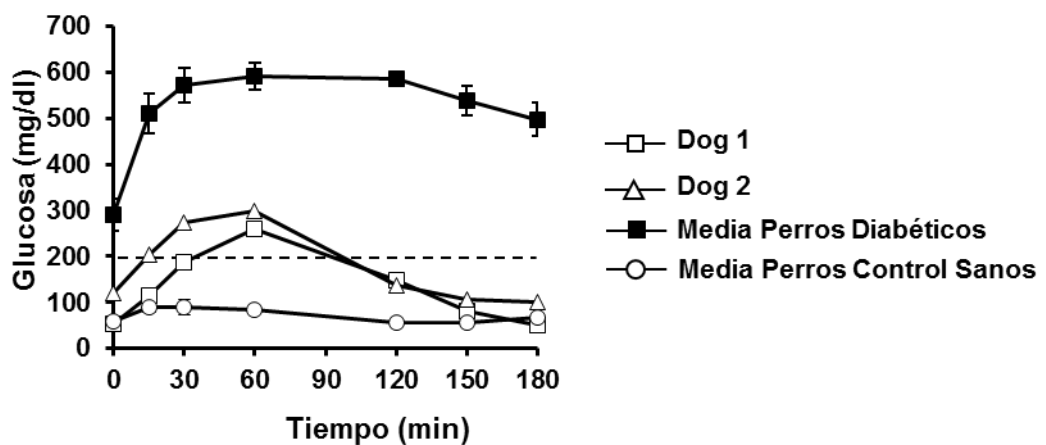


Figura 11. Test oral de tolerancia a la glucosa. El OGTT se realizó con una dosis de glucosa a 1.75 g/kg en perros ayunados durante 12h. Los datos representan el OGTT realizado 1 mes antes del sacrificio, a los 8 años de tratamiento. La media de la curva de OGTT de 6 perros diabéticos no tratados y 4 perros sanos de edad similar se presentan como valores de referencia.

Puesto que, generalmente, los animales diabéticos presentan hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, se llevó a cabo un seguimiento mensual de los niveles de triglicéridos y de colesterol circulante en los perros tratados con AAV1-Ins + AAV1-Gck a lo largo de todo el periodo de seguimiento. Así, se observó que los niveles de triglicéridos y de colesterol total en suero se mantenían dentro del rango de normalidad observado en perros sanos (Kaneko, 2008) (Fig. 12a,b).

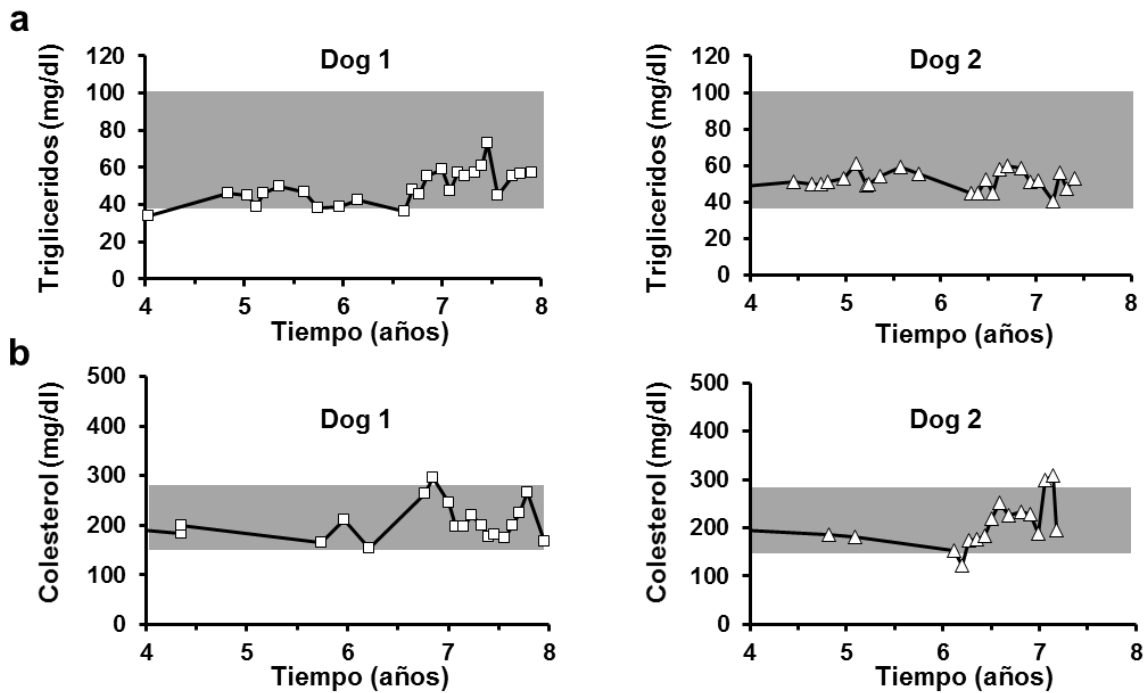


Figura 12. Normalización de parámetros metabólicos tras el tratamiento con AAV1-Ins+Gck. (a,b) Seguimiento de los niveles en suero de triglicéridos (a) y colesterol (b) en perros diabéticos tratados con AAV1-Ins+Gck. A lo largo de los años, los valores se han mantenido dentro de los rangos de normalidad en ambos animales.

Al realizar un tratamiento intramuscular era muy importante asegurar que la morfología de las células musculares manipuladas genéticamente no presentaban alteraciones pese a llevar ocho años expresando Ins y Gck. Para poder evaluar el estado de la musculatura de los animales se realizó una tinción de hematoxilina/eosina (H&E) de cortes histológicos del músculo de los perros obtenidos tras el sacrificio de los animales. No se observaron signos patológicos como inflamación, cambios en el tamaño de las fibras o cambios en la localización de los núcleos en los músculos de estos animales. Esto nos indicaba que la expresión de insulina y glucoquinasa en la musculatura esquelética al cabo de todos estos años de seguimiento, no provocaba alteraciones patológicas evidentes.

Adicionalmente, los animales no presentaron en ningún momento signos de problemas en su movilidad, comportándose de forma análoga a un animal sano.

Dado que la expresión de glucoquinasa en el músculo esquelético, podría incrementar el depósito de glucógeno en dicho músculo, se realizó una tinción específica para el glucógeno (PAS) en cortes histológicos de este tejido. Esta tinción permitió comprobar que no existían diferencias entre los animales tratados con AAV1-Ins + Gck y el animal control, es decir, que no existía acúmulo patológico de glucógeno en las fibras musculares de los animales tratados con AAV1-hIns + rGck (**Fig. 13**).

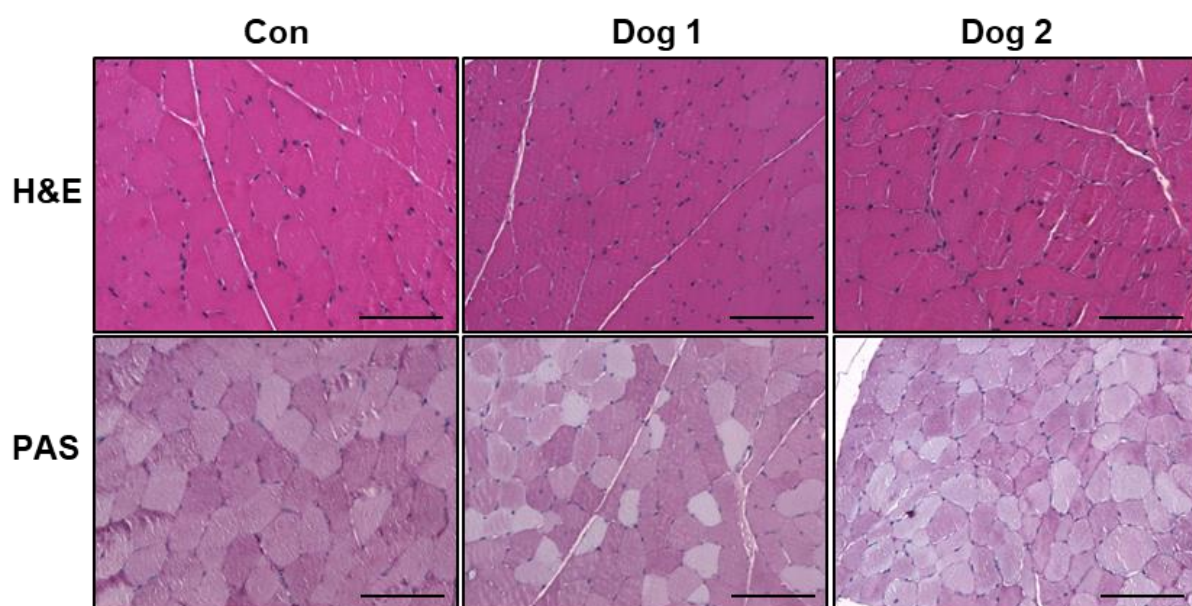


Figure 13. Integridad del músculo esquelético tras 8 años de tratamiento con AAV1-hIns+AAV1-rGck. El análisis histopatológico de muestras de músculo esquelético los a partir de muestras obtenidas durante la necropsia. No se observaron alteraciones patológicas de la morfología muscular en las tinciones con hematoxilina y eosina (H&E). Tampoco se observó acúmulo anormal de glucógeno tras realizar tinciones de Periodic acid Schiff (PAS). Imágenes representativas de perro sano control (Con) se proporcionan como referencia. Ampliación original 200X. Barras:100 μ m.

3. BIODISTRIBUCIÓN DEL VECTOR Y PERSISTENCIA DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES TERAPÉUTICOS

Para poder comprobar la persistencia, biodistribución y expresión de los genes terapéuticos en el músculo esquelético y en hígado, ambos animales fueron sacrificados. Posteriormente, se obtuvieron múltiples muestras de los músculos *quadriceps femoris* y *tibialis cranialis* así como muestras de hígado de los dos animales diabéticos tratados con AAV1-hIns + Gck.

Al determinar la presencia de vectores virales en las diferentes muestras analizadas, se observó en el Dog 1, que el 88% y el 82% de las muestras eran positivas en presencia de genomas virales para AAV1-Ins y para AAV1-Gck, respectivamente (**Fig. 14a**). El porcentaje fue algo más bajo en Dog 2, en el cual se detectó AAV1-Ins y AAV1-Gck alrededor del 63% de las muestras (**Fig. 14b**). Por el contrario, los niveles de genomas virales no eran cuantificables en hígado en ninguno de los animales (**Fig. 14a,b**). Estos resultados indicaban que tras la administración intramuscular, los vectores AAV1-hIns + Gck transdujeron eficientemente el músculo esquelético pero no el hígado.

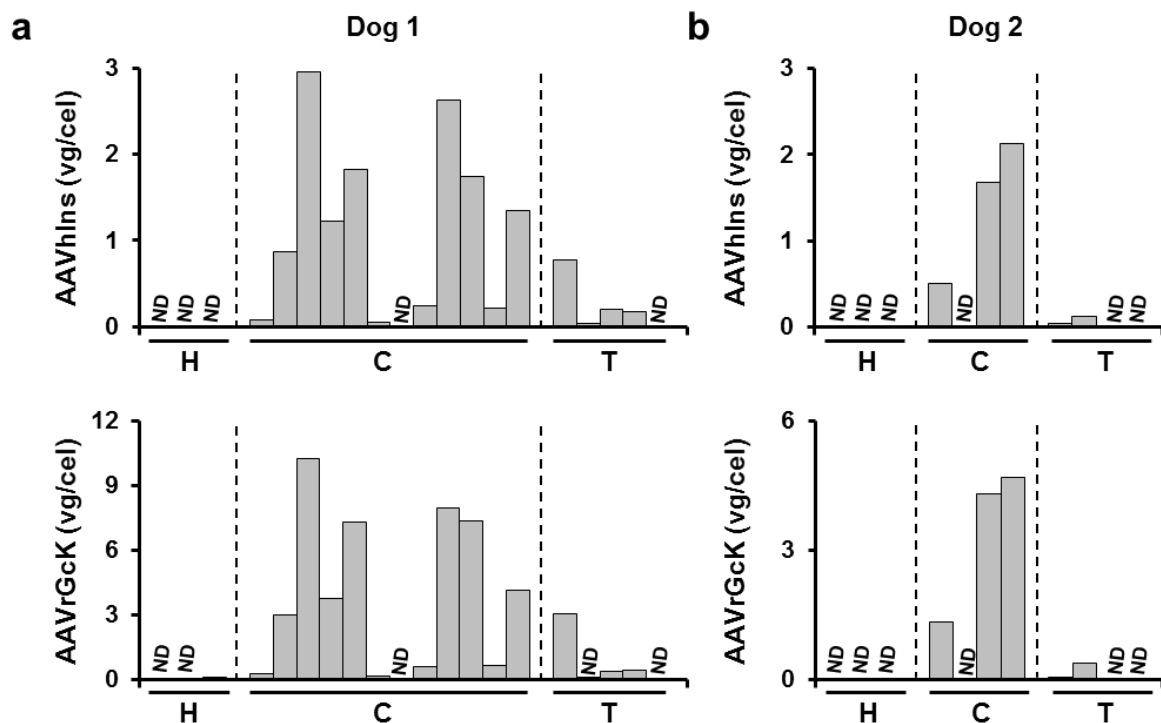


Figura 14. Biodistribución de los vectores virales. (a,b) Cuantificación de genomas virales (vg) número de copias de AAV1-hIns (paneles superiores) y AAV1-rGck (paneles inferiores), expresados en genomas virales (o vectores) por célula (vg/cel), en muestras de hígado (H), *quadriceps femoris* (C) y *tibialis cranialis* (T) de Dog 1 y Dog 2 obtenidos durante la necropsia. ND, no detectable.

Para valorar si los genomas virales detectados mantenían la capacidad para expresar los genes de la insulina y de la glucoquinasa, se realizó un análisis de RT-qPCR. En la mayoría de muestras de músculo esquelético analizadas se pudo detectar la expresión tanto de hIns como de rGck en ambos animales. En cambio, en los hígados de ambos animales no se observaba expresión de estos genes. Estos resultados confirmaban que los genomas detectados mantenían la capacidad de expresar insulina y glucoquinasa durante los 8 años del tratamiento con una única dosis de vector AAV1-Ins y AAV1-Gck. (Fig. 15a, b).

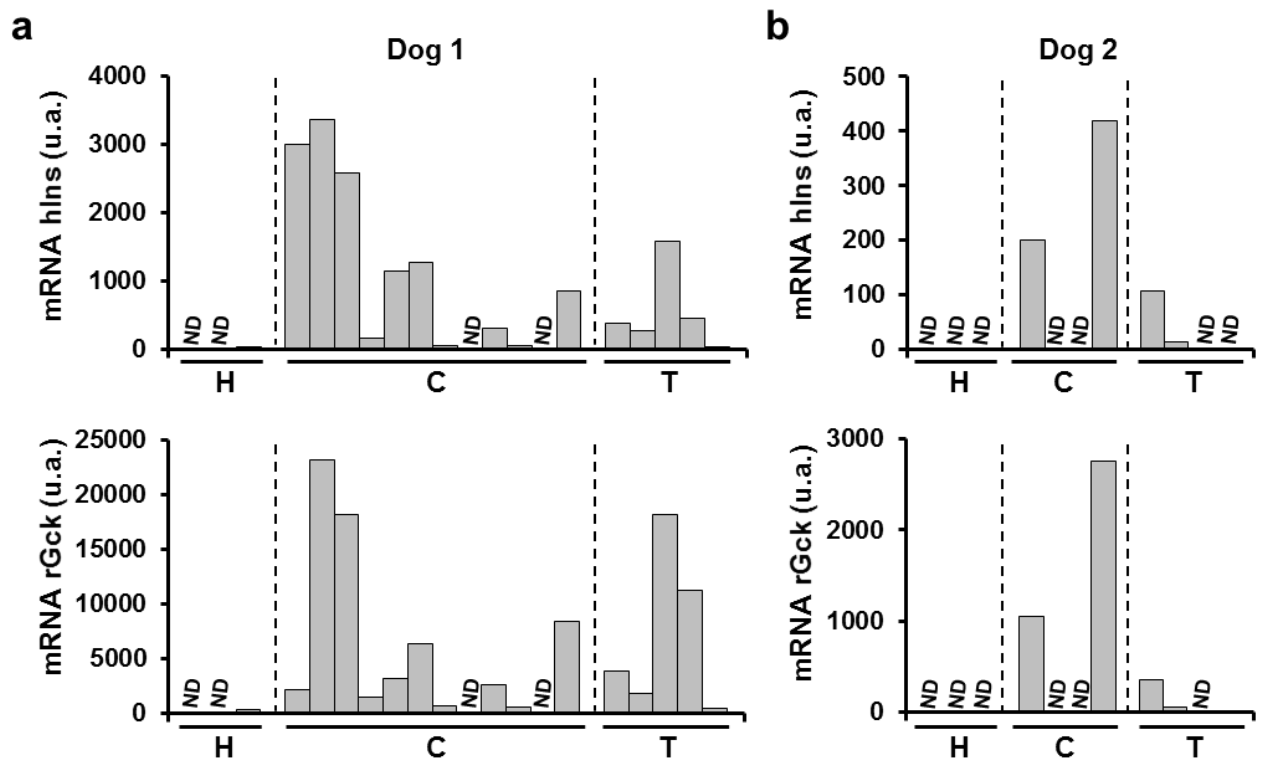


Figura 15. Expresión de los genes terapéuticos tras 8 años de tratamiento. (a,b) Expresión de Insulina humana (paneles superiores) y glucoquinasa de rata (paneles inferiores) en el hígado (H) y en los músculos *quadriceps femoris* (C) y en *tibialis cranialis* (T) de Dog 1 y Dog 2. u.a, unidades arbitrarias. ND, no detectable.

Para valorar si el mRNA codificante para la rGck detectado en las muestras de tejido daba lugar a la enzima funcional, se determinó la actividad glucoquinasa en las diferentes muestras de los músculos obtenidos.

Dado que en animales sanos la enzima glucoquinasa no se encuentra en músculo, la actividad detectada correspondía exclusivamente a la producida por los músculos que expresaban la rGck. De esta manera, en casi todas las muestras de *quadriceps femoris* y *tibialis cranialis* de ambos perros se detectó actividad glucoquinasa (**Fig. 16c**).

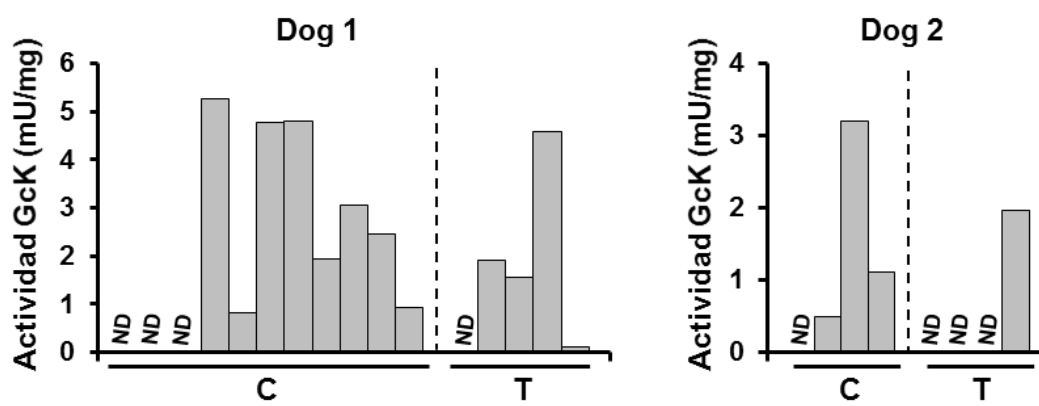


Figura 16. Detección de actividad glucoquinasa en los músculos *quadriceps femoris* y en *tibialis cranialis* de Dog 1 y Dog 2 detectados ~8 años después de una sola administración de los vectores de terapia génica. ND, no detectable.

En conjunto, estos resultados proporcionan pruebas sólidas de persistencia de genomas virales en los músculos inyectados. De esta forma, la expresión durante 8 años de las proteínas terapéuticas, después de una sola administración del vector permitió el control de la glucemia en estos animales durante un largo periodo tan largo de tiempo.

Parte 2: Generación de un vector adeno-asociado de serotipo 1 (AAV1) dual para la expresión conjunta de insulina y glucoquinasa

1. GENERACIÓN DE UN VECTOR DUAL PARA LA EXPRESIÓN DE INSULINA Y GLUCOQUINASA

La estrategia de terapia génica centrada en la utilización de dos vectores virales codificantes para Ins-Gck ha demostrado ser eficaz para contrarrestar la diabetes. Sin embargo, para poder avanzar hacia una posible aplicación clínica de esta aproximación era necesario obtener un vector AAV que permitiera expresar a la vez el gen de la insulina y el de la Gck. Esto representaba generar un único vector con los dos genes terapéuticos bajo el control de diferentes promotores y secuencias reguladoras. Un vector único presentaba grandes ventajas en comparación con la administración de dos vectores individuales. La expresión conjunta de Ins-Gck podría mediar un efecto sinérgico ya que las células musculares transducidas expresarían los dos genes terapéuticos a la vez. Por otra parte, la generación de este vector dual AAV1-Ins-Gck permitiría disminuir la dosis del vector a administrar, lo cual disminuiría el riesgo de inmunidad desencadenada por la cápside u otras toxicidades. Además, desde un punto de vista regulador, el uso de un vector dual facilitaría en gran medida todo el proceso del desarrollo en un futuro de un posible tratamiento para pacientes humanos. Finalmente, el uso de un vector dual permitiría una reducción importante en el coste de fabricación de vectores AAV. Por tanto, la segunda parte de esta tesis se centró en la generación de un vector que codificase conjuntamente para la insulina y la glucoquinasa.

La primera estrategia para generar vectores duales AAV1 para mediar la transferencia de genes insulina y glucoquinasa al músculo esquelético habría sido incorporar dentro del mismo vector los *cassettes* de expresión CMV-Insulina y CMV-Glucoquinasa que se encontraban en los vectores previamente utilizados en los estudios en ratones y perros. En estos vectores, la expresión de Ins y de la Gck estaba bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, esta opción fue descartada porque la presencia del mismo promotor en 2 regiones dentro de la misma construcción aumenta dramáticamente el riesgo de eventos de recombinación intramolecular que a veces se observan durante la producción de AAV debido a la presencia de secuencias repetidas. Asimismo, el tamaño del transgén superaría largamente la capacidad de encapsidación (4.7Kb) del AAV afectando a su producción.

Por tanto, se procedió a diseñar y generar diferentes constructos que contenían los dos genes terapéuticos y diferentes regiones reguladoras en diferentes conformaciones.

1.1. Diseño y generación del constructo dual CMV-Insulina-RSV-Glucoquinasa

Teniendo en cuenta las restricciones en el uso de los promotores discutidas anteriormente, el promotor ubicuo del *Rous Sarcoma Virus* (RSV) fue elegido para dirigir la expresión de glucoquinasa en la construcción del nuevo vector AAV dual. Se seleccionó este promotor ya que es similar al promotor CMV y media una fuerte expresión del transgén en las células musculares (Yue and Dongsheng, 2002). Adicionalmente, su pequeño tamaño es conveniente dada la limitada capacidad de los vectores AAV.

Por lo tanto, se generó un constructo dual AAV1-Ins-Gck con la secuencia codificante de insulina humana dirigida por el promotor CMV y la secuencia codificante de glucoquinasa de rata dirigida por el promotor RSV (**Fig. 17**). En este constructo dual, la secuencia poliA de SV40 se clonó después de los genes de insulina y glucoquinasa:

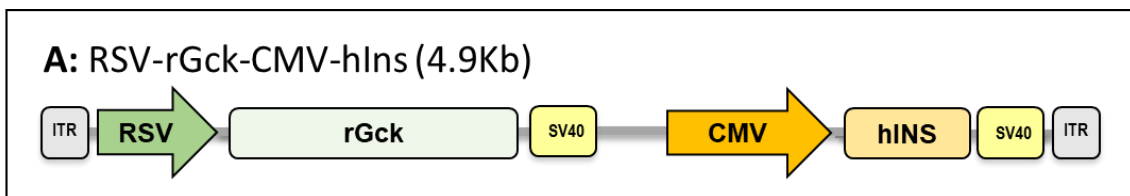


Figura 17. Representación esquemática del vector AAV dual RSV-rGck-CMV-hIns. ITR: *Inverted Terminal Repeat*; RSV: promotor del virus de Sarcoma de Rous; rGck: cDNA de glucoquinasa de rata; SV40: señal de poliadenilación del simian virus 40; CMV: promotor del citomegalovirus humano; hINS: cDNA de insulina humana.

Además de generar un vector dual AAV1-Ins-Gck, se generaron dos constructos individuales que codifican únicamente para la insulina humana y para la glucoquinasa de rata (**Fig. 18**), para la comparación con el vector dual AAV1-Ins-Gck A:

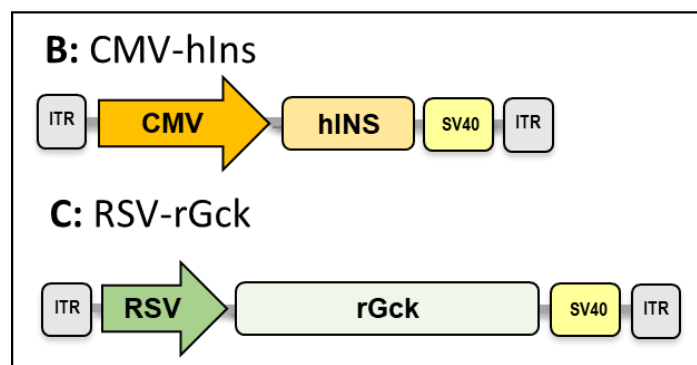


Figure 18. Representación esquemática de los vectores AAV individuales. ITR: *Inverted Terminal Repeat*; CMV: promotor del citomegalovirus humano; hINS: cDNA de insulina de rata; SV40: señal de poliadenilación del simian virus 40; RSV: promotor del Virus Sarcoma de Rous Sarcoma; rGck: cDNA de glucoquinasa de rata.

La funcionalidad del plásmido dual pRSV-rGck-CMV-hIns (**A**) se evaluó *in vitro* antes de la producción de AAV. Para ello, células HEK293 se transfectaron con los plásmidos A, B y C. El análisis por PCR cuantitativa del RNA, obtenido de los extractos de las células transfectadas, mostró que tanto la insulina como la glucoquinasa se expresaban con el vector dual (**A**) a niveles comparables o incluso superiores a los vectores individuales (**B**, **C**) (Fig. 19 a,b)

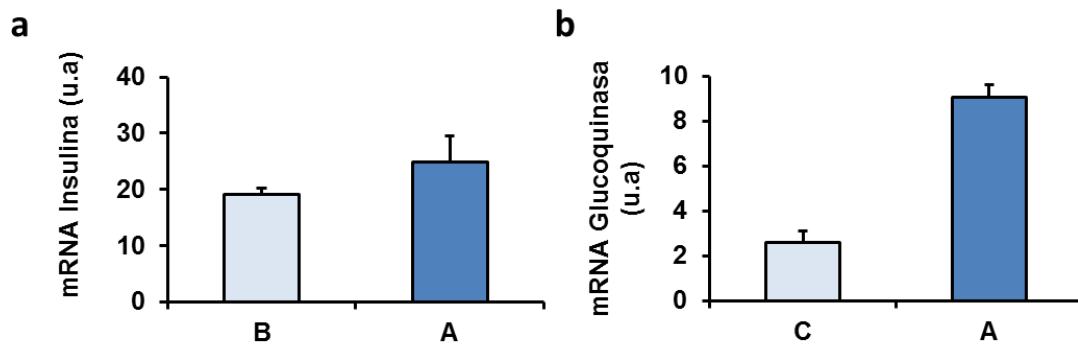


Figura 19. Expresión de insulina y glucoquinasa en células HEK293. (a) Expresión de la insulina en células transfectadas con el plásmido CMV-hIns (B) o RSV-rGck-CMV-hIns (A). (b) Expresión de glucoquinasa en células transfectadas con RSV-rGck (C) o con RSV-rGck-CMV-hIns (A). u.a, unidades arbitrarias.

Una vez verificada *in vitro* la funcionalidad del constructo RSV-rGck-CMV-hIns (**A**), se utilizó este plásmido para producir el correspondiente vector AAV1 dual mediante el método de triple transfección en células HEK293 (ver apartado de Métodos). La primera producción de AAV1-RSV-rGck-CMV-hIns no proporcionó vectores AAV y el rendimiento de la segunda producción únicamente fue de 4×10^{11} Vg/roller bottle (RB), un valor considerablemente más bajo que el rendimiento promedio para la producción de vectores AAV de serotipo 1 de nuestro laboratorio, que generalmente es de alrededor de 2×10^{12} vg/RB. Este bajo rendimiento podría estar de acuerdo con la baja eficiencia en la encapsidación de genomas de gran tamaño ya que el tamaño final del constructo (4.9 kb) era superior al límite de capacidad de encapsidación de los AAV1 (4.7 kb). Sin embargo, este resultado no era previsible porque en algunos casos los constructos AAV de aproximadamente 5 kb se han podido producir en nuestro laboratorio.

1.2. Generación de nuevos constructos AAV duales optimizados con CMV-Insulina-RSV-Glucoquinasa

Dado el bajo rendimiento en la producción de los lotes de AAV obtenidos con los constructos duales anteriores, se decidió utilizar nuevos *cassettes* para la expresión doble de insulina y glucoquinasa. Con este fin, se diseñó un sistema modular que permitió probar diferentes combinaciones de secuencias codificantes y secuencias reguladoras (promotores, secuencias de poliA) así como diferentes orientaciones de los genes dentro del vector y con un tamaño óptimo para la encapsidación. Los diferentes componentes del sistema modular se sintetizaron de *ново* y se realizó un cambio de la glucoquinasa de rata por la glucoquinasa humana para evitar en un futuro problemas de inmunogenicidad en pacientes humanos. Esta nueva aproximación ha permitido simplificar el diseño y evaluación de los vectores.

En primer lugar, se generaron 4 constructos duales que contenían la secuencia codificante de la insulina bajo el control del promotor CMV y la secuencia codificante de glucoquinasa humana bajo el control del promotor RSV. Así, se generaron dos constructos, el primero de ellos (**D**) que contenía primero el *cassette* CMV insulina seguido del *cassette* RSV glucoquinasa, y el segundo (**E**) contenía primero el *cassette* RSV-glucoquinasa seguido del *cassette* CMV-insulina. Los otros dos constructos correspondían con estos elementos orientados hacia el exterior (**F**) o hacia el interior (**G**) (**Fig. 20**)

Además, para evitar la presencia de secuencias repetidas en los diferentes constructos, en este nuevo conjunto de vectores, en el *cassette* CMV-hIns se incluyó la secuencia de poliA SV40, mientras que la secuencia poliA de la hormona de crecimiento bovina (bGH) se clonó en el *cassette* RSV-hGck. Ambas señales de poli A son de un tamaño reducido y median una alta expresión del transgén. Los nuevos constructos generados se indican en la **fig. 20**.

Todos los constructos generados tenían un tamaño aproximado de 4.7 Kb, límite máximo de encapsidación de un AAV.

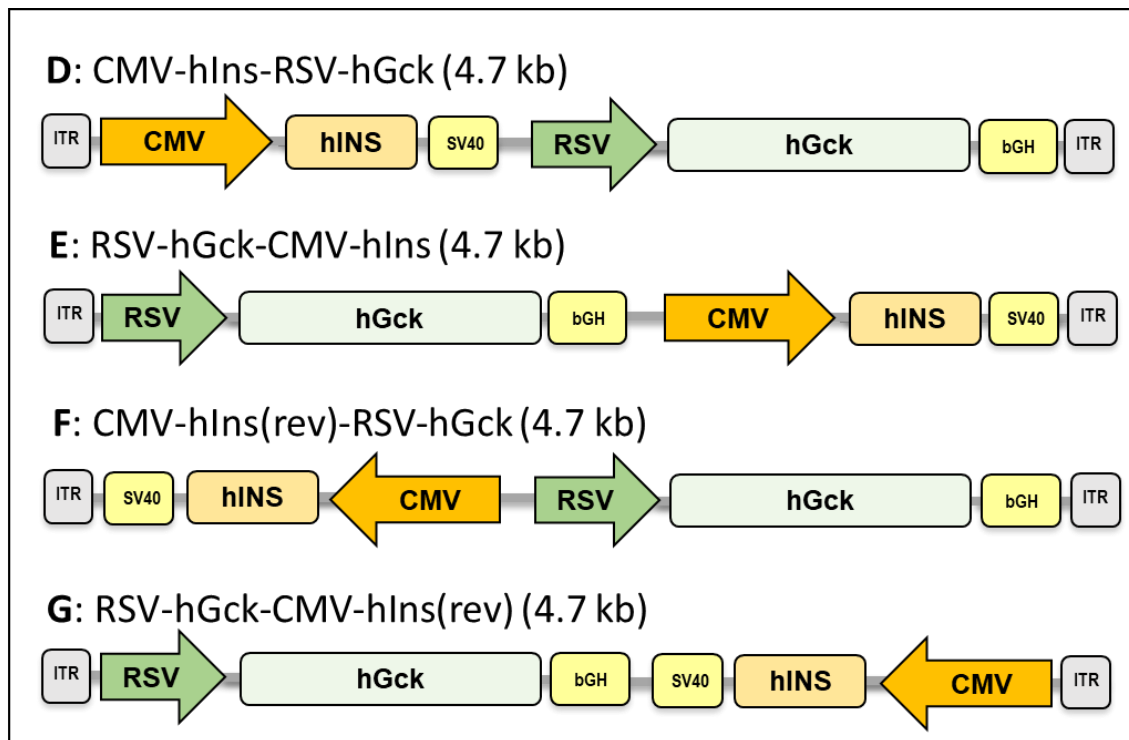


Figura 20. Representación esquemática de los vectores AAV duales. ITR: *Inverted Terminal Repeat*; CMV: promotor del citomegalovirus humano; hINS: cDNA de insulina humana; SV40: señal de poliadenilación del simian virus 40; RSV: promotor del Virus del Sarcoma de Rous; hGck: cDNA de glucoquinasa humana; bGH: señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bobina.

Además de las 4 construcciones de gen doble AAV1-hIns-hGck (D, E, F y G) anteriormente mencionadas, se generaron también dos plásmidos adicionales de un solo gen que codificaban para insulina o glucoquinasa (H y I) (Fig. 21). Estos plásmidos se obtuvieron para poder comparar la expresión de Ins y Gck en el vector individual como en los 4 vectores dobles.

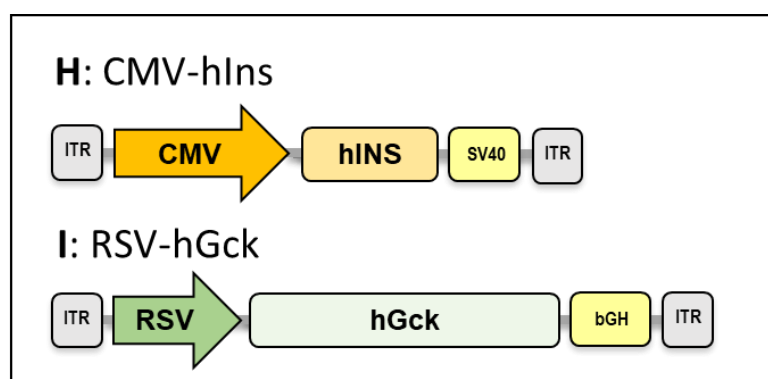


Figura 21. Representación esquemática de los vectores AAV individuales. ITR: *Inverted Terminal Repeat*; CMV: promotor del citomegalovirus humano; hINS: cDNA de insulina humana; SV40: señal de poliadenilación del simian virus 40; RSV: promotor del Virus del Sarcoma de Rous; hGck: cDNA de glucoquinasa humana; bGH: señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

Se evaluó la función de los plásmidos D, E, F y G de los vectores duales *in vitro* mediante la transfección de células HEK293. Se observó que constructo F (CMV-hIns(Rev)-RSV-rGck) presentaba una mayor expresión tanto de insulina como de glucoquinasa (**Fig. 22**).

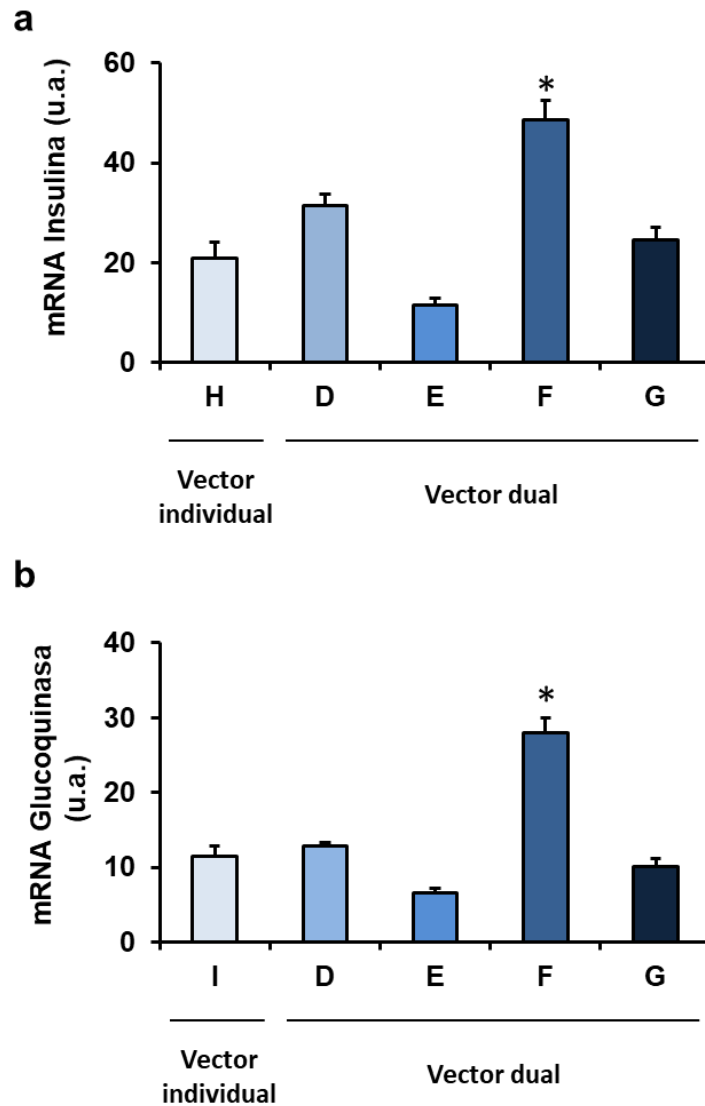


Figura 22. Expresión de insulina y de glucoquinasa en células HEK293. (a) representación de la expresión de insulina humana en células transfectadas con los plásmidos CMV-hIns (**H**), CMV-hIns-RSV-hGck (**D**), RSV-hGck-CMV-hIns (**E**), CMV-hIns(Rev)-RSV-hGck (**F**) y RSV-hGck-CMV-hIns(Rev) (**G**) (b) representación de la expresión de glucoquinasa humana en células transfectadas con los plásmidos CMV-hIns (**H**), CMV-hIns-RSV-hGck (**D**), RSV-hGck-CMV-hIns (**E**), CMV-hIns(Rev)-RSV-hGck (**F**) y RSV-hGck-CMV-hIns(Rev) (**G**). u.a, unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como la media \pm EEM, * $p < 0.05$.

Por tanto, el plásmido F se utilizó para producir el correspondiente vector AAV1 dual. No obstante, el tamaño del constructo F (CMV-hIns(Rev)-RSV-rGck) estaba dentro de la capacidad óptima de encapsidación de AAV, se obtuvo nuevamente un bajo rendimiento del lote de los vectores producidos, ya que presentaban un título de 5.5×10^{11} vg/RB.

Así pues, era necesario desarrollar nuevos constructos con el fin de poder aumentar el rendimiento en la producción de los vectores AAV1- Ins-Gck duales.

1.3. Constructos AAV duales optimizados miniCMV-Insulina-RSV-Glucoquinasa

En nuestro laboratorio habíamos observado que vectores virales con tamaños teóricamente correctos para su encapsidación en AAV producían títulos bajos. Esto podría estar relacionado con la estructura del propio vector u otros factores. Por ello, planteamos reducir aún más el tamaño del constructo con el fin de intentar mejorar la producción de los vectores AAV. Con esta finalidad, se substituyó el promotor CMV por una versión corta de dicho promotor denominado mini CMV. Este promotor, que media una fuerte expresión, aunque inferior al CMV, se ha utilizado ampliamente en la literatura.

Se generaron 4 nuevos constructos duales que incluían la secuencia codificante de la insulina humana bajo el control del promotor mini CMV y la secuencia codificante de glucoquinasa humana controlada por el promotor RSV. El poliA del SV40 se utilizó junto al *cassette* de Ins y de la bGH se utilizó junto al *cassette* de la Gck. A continuación, se analizó el efecto en las diferentes posiciones del *cassette* de expresión, posicionando primero el *cassette* de expresión de la insulina o el *cassette* de expresión de la glucoquinasa primero y probando también la orientación inversa tal y como se muestra en la **Fig. 23**. Así obtuvieron 4 nuevos constructos.

Además de estos 4 nuevos constructos AAV1-hIns-hGck duales (**J, K, L y M**), se generó un nuevo constructo codificante solo para insulina AAV1-miniCMV-hIns (**N**), utilizando el mismo plásmido para poder compararlo con los 4 nuevos constructos AAV1-hIns-hGck. El plásmido codificante únicamente para glucoquinasa fue el RSV-hGck (**I**), generado anteriormente (**Fig. 24**).

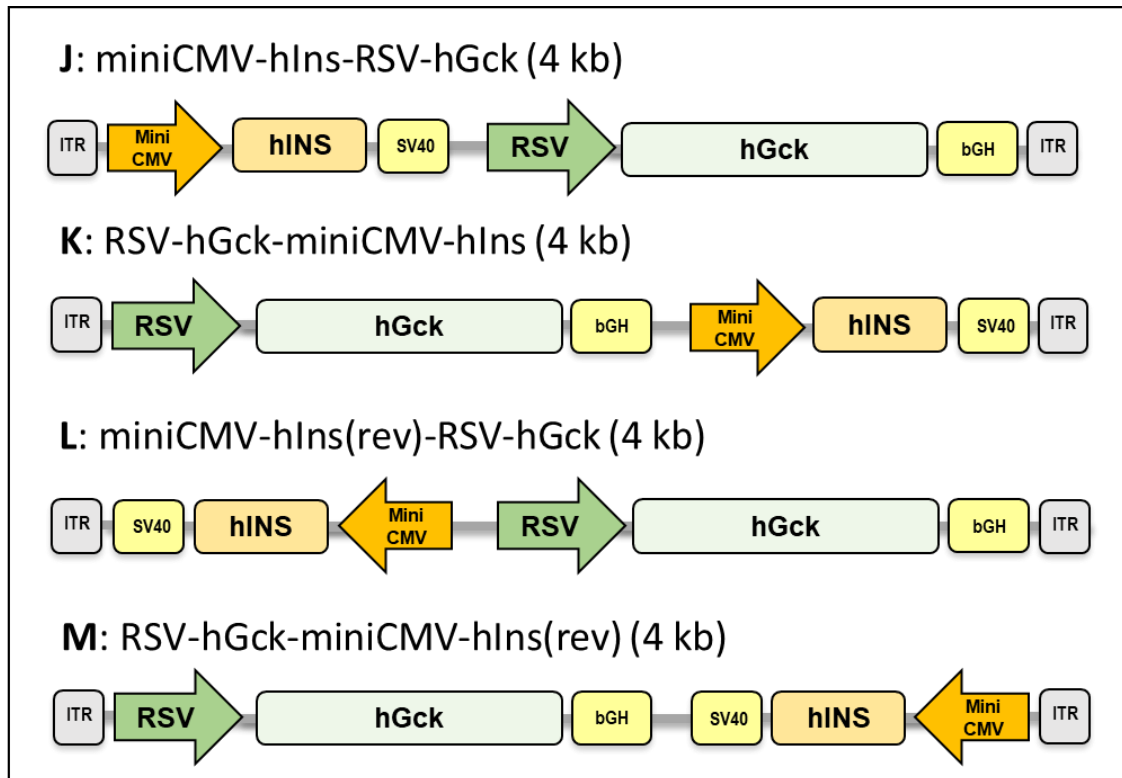


Figura 23. Representación esquemática de los constructos AAV duales optimizados. ITR: *Inverted Terminal Repeat*; MiniCMV: promotor del minicitomegalovirus humano; hINS: cDNA de insulina humana; SV40: señal de poliadenilación del *simian virus 40*; RSV: promotor del Virus del Sarcoma de Rous; hGck: cDNA de glucoquinasa humana; bGH: señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

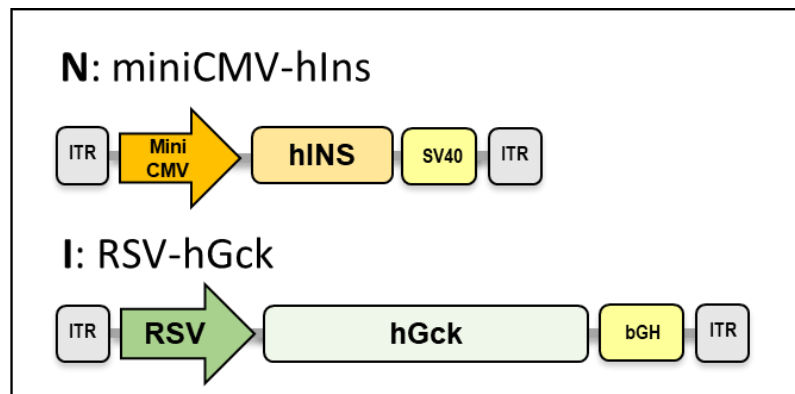


Figura 24. Representación esquemática de los vectores AAV codificantes de un solo gen que contiene el promotor miniCMV. ITR: *Inverted Terminal Repeat*; MiniCMV: promotor del minicitomegalovirus humano; INS: cDNA de insulina humana; SV40: señal de poliadenilación del *simian virus 40*; RSV: promotor del Virus del Sarcoma de Rous; Gck: cDNA de glucoquinasa humana; bGH: señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

A continuación, se evaluó la funcionalidad de los plásmidos duales (**J**, **K**, **L** y **M**) *in vitro* transfectando células HEK293. Tras analizar la expresión de los diferentes genes por RT-PCR en extractos celulares, se observó que el constructo (**L**), miniCMV-hIns (rev)-RSV-hGck, mostraba una expresión más alta tanto de insulina como de glucoquinasa (**Fig. 25**).

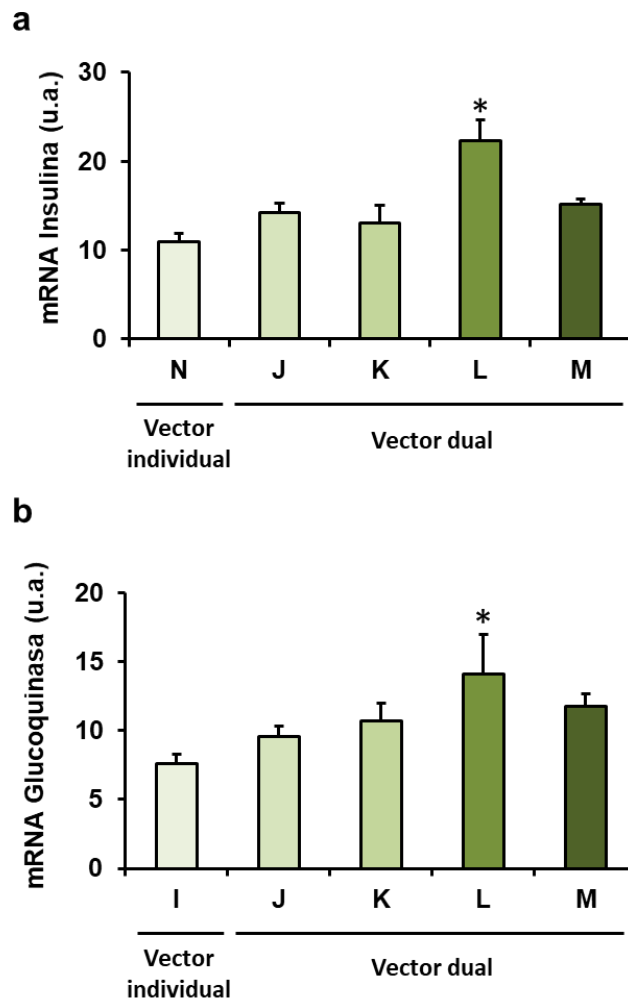


Figura 25. Niveles de expresión de Insulina y Glucoquinasa en células HEK293. (a) Representación de la expresión de insulina humana en células transfectadas con los plásmidos miniCMV-hIns (**N**), miniCMV-hIns-RSV-Gck (**J**), RSV-hGck-miniCMV-hIns (**K**), miniCMV-hIns(rev)-RSV-hGck (**L**) or RSV-hGck-miniCMV-hIns(rev) (**M**). (b) Representación de la expresión de glucoquinasa humana en células transfectadas con los plásmidos miniCMV-hIns (**N**), miniCMV-hIns-RSV-Gck (**J**), RSV-hGck-miniCMV-hIns (**K**), miniCMV-hIns(rev)-RSV-hGck (**L**) or RSV-hGck-miniCMV-hIns(rev) (**M**). u.a, unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como la media \pm EEM, * $p < 0.05$.

Por tanto, se pasó a producir los vectores virales AAV a partir del constructo (**L**) (miniCMV-hIns (rev) -RSV-hGck). Esta vez, los rendimientos de la producción de AAV que se obtuvieron estaban dentro de los valores esperados, presentando un título de 2.1×10^{12} vg/RB para AAV1-miniCMV-hIns (rev) -RSV-hGck (**L**).

2. COMPARACIÓN DEL VECTOR DUAL “L” RESPECTO A LOS VECTORES INDIVIDUALES.

Seguidamente, para evaluar si el vector dual AAV1-Ins+Gck (L) era igual o superior a los vectores individuales AAV1-Ins (N) + AAV1-Gck (I) administrados a la vez, se analizó su eficacia *in vivo* tanto en ratones sanos como en diabéticos.

2.1. Evaluación de la tolerancia a la glucosa en ratones sanos tratados con el vector AAV “L”

Se trataron dos grupos de ratones sanos con los dos vectores individuales juntos (N+I) (AAV1-miniCMV-hINS y AAV1-RSV-hGck), con el vector dual (L) (AAV1-miniCMV-hINS-rev-RSV-hGck) y como control (CT) se trataron animales con AAV1-CMV-null. Los vectores se administraron intramuscularmente en los músculos *tibialis cranialis*, *gastrocnemius* y *quadriceps femoris* de ambas extremidades posteriores a una dosis de cada vector de 5×10^{10} vg/músculo.

A continuación, para demostrar la eficacia de los nuevos constructos duales, se evaluó la capacidad de los vectores anteriormente descritos para mejorar la captación de glucosa *in vivo*. Con este fin, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) en la que se inyectaron intraperitonealmente todos los grupos de ratones con 2 g de glucosa/Kg de peso corporal y se determinaron los niveles de glucosa en sangre durante 120 minutos. Como se observa en la **Fig. 26**, los animales inyectados con el vector dual L mostraron mejor tolerancia a la glucosa que los animales inyectados con la combinación de los dos vectores individuales.

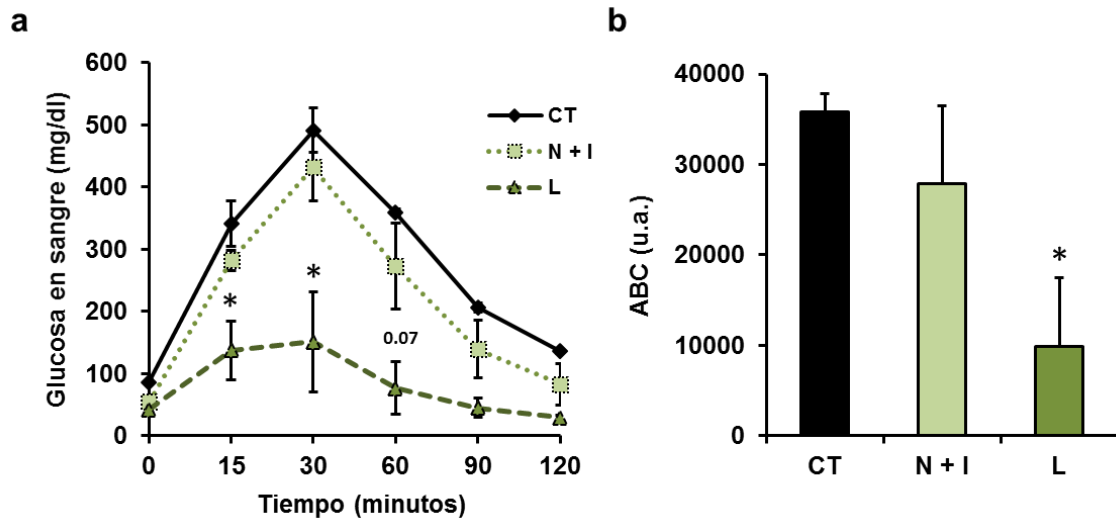


Figura 26. Comparación de la captación de glucosa tras una sobrecarga de glucosa en animales inyectados a la vez con vectores AAV simples o con vectores AAV duales. (a) ratones control (CT), ratones inyectados con la combinación de vectores simples AAV1-miniCMV-hINS y AAV1-RSV-hGck (N + I) y ratones inyectados con el vector dual AAV1-miniCMV-hINS-rev-RSV-hGck (L) se les inyectó intraperitonealmente 2 g de glucosa/kg de peso corporal. Se tomaron muestras de sangre de la cola de los animales en los tiempos indicados y se determinó la concentración de glucosa. (b) Cálculo del área bajo la curva (ABC) de la prueba de tolerancia a la glucosa. u.a, unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como la media \pm EEM, n= 5 animales por grupo, * p <0,05 vs N + I.

2.2. Evaluación de la expresión del transgén de la insulina y el de la glucoquinasa *in vivo* en ratones sanos

Tres semanas después de la administración del vector, los animales se sacrificaron y la expresión de ambos transgenes (insulina y glucoquinasa) se analizó mediante RT-PCR cuantitativa en los diferentes grupos experimentales, animales tratados con los vectores **N+I** o con el vector dual "**L**". Se observó que la expresión tanto de insulina (**Fig. 27a**) como de glucoquinasa (**Fig. 27b**) fue mayor en los músculos de los animales que recibieron el vector dual (**L**), en comparación con los inyectados con la combinación de los dos vectores individuales (**N+I**).

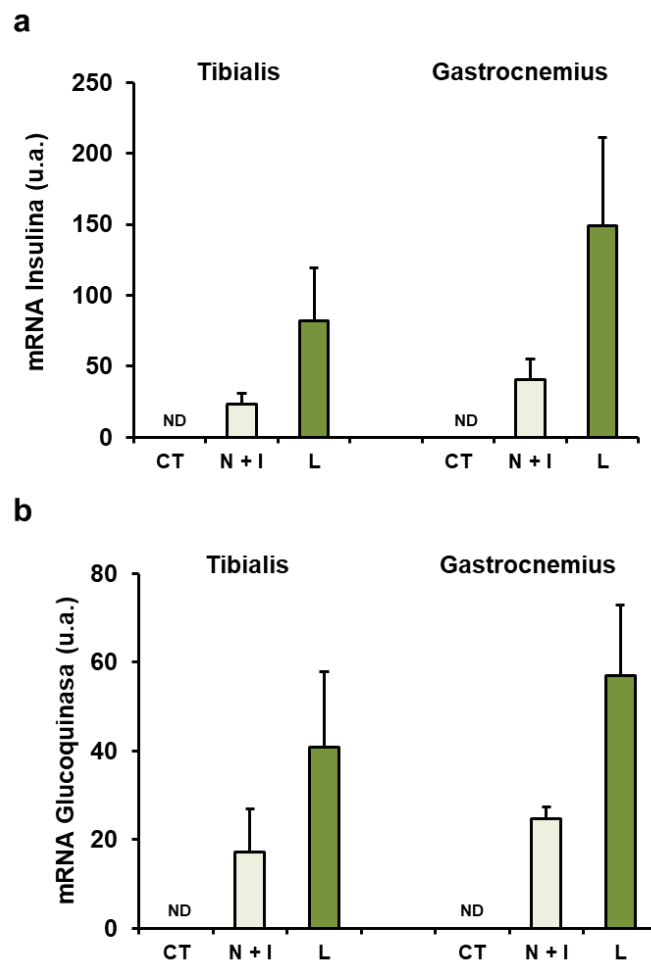


Figura 27. Niveles de expresión de insulina y glucoquinasa en la musculatura esquelética de los animales inyectados con los diferentes vectores AAV1. Tres semanas después de la administración del vector, se analizó la expresión de insulina (**a**) y de glucoquinasa (**b**) por PCR cuantitativa en *tibialis cranialis* y *gastrocnemius* de ratones inyectados con AAV1-CMV-null (**CT**), o en ratones inyectados con la combinación de los vectores simples (single) AAV1-miniCMV-hIns y AAV1-RSV-hGck (**N+I**) o con el vector dual AAV1-miniCMV-hIns-rev-RSV-hGck (**L**). La expresión de insulina y glucoquinasa se normalizó a la expresión de 36B4. N.D, no detectado. u. a, unidades arbitrarias.

2.3. Evaluación de la eficacia *in vivo* del vector AAV “L” en ratones diabéticos

Para evaluar la eficacia del vector dual (L) (AAV1-miniCMV-hIns(rev)-RSV-hGck) en animales diabéticos, se administró una dosis de 5×10^{10} vg/músculo, en los músculos *tibialis cranialis*, *gastrocnemius* y *quadriceps femoris* de ambas extremidades posteriores de ratones diabéticos, tras tratamiento con estreptozotocina (STZ). Como control, los dos vectores simples se administraron conjuntamente (N+I) (AAV1-miniCMV-hINS y AAV1-RSV-hGck). Además, se trató a un grupo de animales con AAV1-CMV-null (CT).

Como se observa en la **Fig. 28**, los animales diabéticos inyectados con el vector dual “L” mostraron niveles disminuidos de glucemia en condiciones de ayuno en comparación con los animales tratados con la combinación de vectores simples N + I. Los niveles de glucosa de los animales tratados con el vector dual “L” fueron similares a los de los ratones sanos no diabéticos (**Fig. 28**).

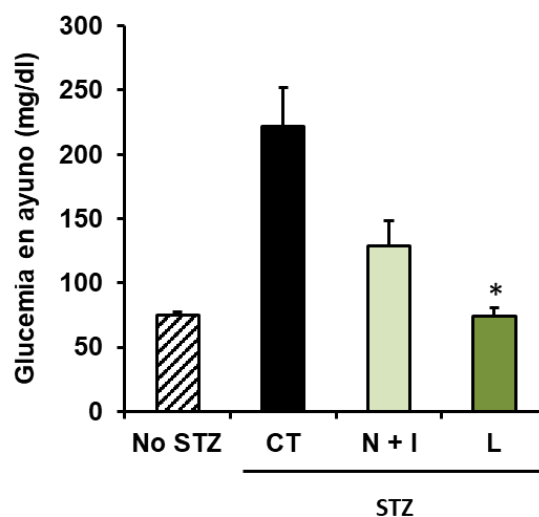


Figura 28. Niveles de glucosa en sangre en ayuno. Obtenidas de la cola de ratones sanos (No STZ), los ratones control diabéticos (CT), los ratones diabéticos tratados con la combinación de vectores virales simples AAV1-miniCMV-hIns y AAV1-RSV-hGck (N + I), y los ratones diabéticos tratados con el vector viral dual AAV1-miniCMV-hIns-rev-RSV-hGck (L).

Ocho semanas después de la administración de los AAV, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa. En todos los grupos de ratones se inyectaron intraperitonealmente 1 g de glucosa /Kg de peso corporal y se determinaron los niveles de glucosa en sangre durante 120 minutos.

Se observó que los animales diabéticos inyectados con el vector dual “L” mostraron mayor tolerancia a la glucosa que los animales inyectados con la combinación de los vectores simples (N + I) (Fig. 29a,b).

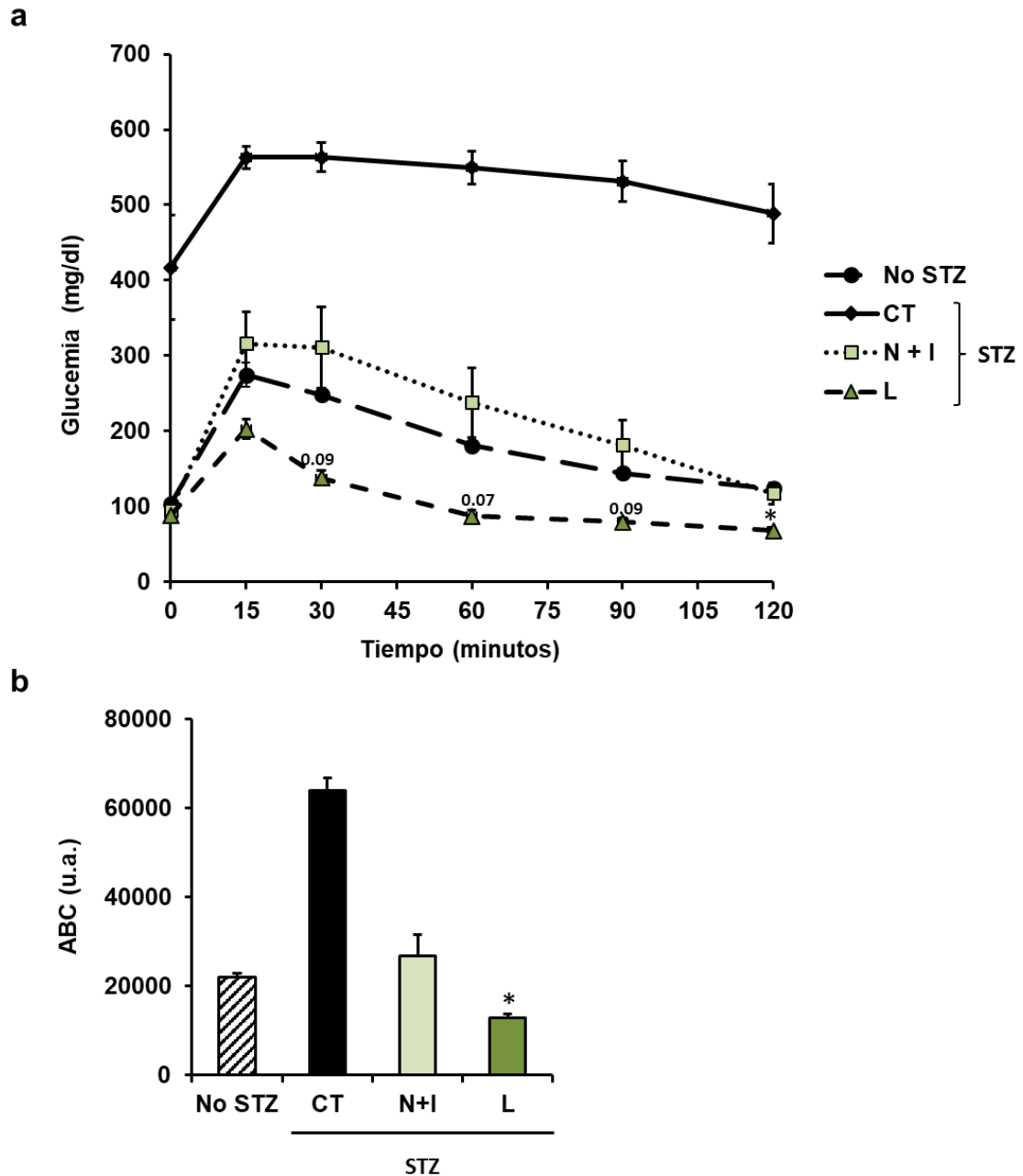


Figura 28. Comparación de la captación de glucosa tras una sobrecarga de glucosa en animales diabéticos inyectados con una combinación de vectores simples o con el vector AAV dual. A los ratones sanos (No STZ), los ratones control diabéticos (CT), los ratones diabéticos tratados con la combinación de vectores virales simples AAV1-miniCMV-hIns y AAV1-RSV-hGck (N + I), y los ratones diabéticos tratados con el vector viral dual AAV1-miniCMV-hIns-rev-RSV-hGck (L) se les administró intraperitonealmente 1 g de glucosa/Kg peso animal. (a). Glucemia en las muestras de sangre obtenidas de la cola en los animales a los tiempos indicados. (b) Cálculo del área por debajo de la curva (ABC). u.a., unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como la media \pm EEM, n= 4-6 animales por grupo, * $p < 0.05$ vs N + I.

Por tanto, todos estos resultados mostraron que se habría conseguido un vector AAV dual “L” que expresaba conjuntamente Ins y Gck y permitía contrarrestar la hiperglucemia diabética. Este vector se utilizará en los estudios futuros hacia el desarrollo de una posible terapia para el tratamiento de la diabetes tipo 1.

V. DISCUSIÓN

El objetivo principal de cualquier terapia para contrarrestar la Diabetes Mellitus que cursa con deficiencia de insulina es conseguir la normoglucemia en los pacientes, previniendo la aparición de episodios de hiperglucemia, los cuales causan el desarrollo de las severas complicaciones secundarias. La terapia de reemplazo convencional requiere el uso de altas dosis de insulina, lo que aumenta la probabilidad de aparición de episodios hipoglucémicos (The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS, 1998). Además, para lograr un control óptimo, cualquier aproximación terapéutica debe ser capaz de responder rápidamente a los cambios de la glucosa en sangre, como los asociados a la ingesta de alimentos, al ejercicio o al estrés.

En nuestro estudio, una única administración intramuscular conjunta de vectores AAV1 que expresaban la insulina humana y de vectores AAV1 que expresaban la glucoquinasa de rata fue capaz de lograr el control eficiente de la hiperglucemia y la normalización de los parámetros bioquímicos en perros Beagle diabéticos durante toda la vida de los animales. Además, el test de tolerancia oral a la glucosa realizado a los animales durante el último año de estudio, indicó que la capacidad de captación de glucosa por los músculos tratados persistió a lo largo de los años. Otra prueba de eficacia fue proporcionada por el hecho de que los perros tratados con AAV-Ins y AAV-Gck mostraron niveles de fructosamina dentro del rango que indica excelente control glucémico en medicina veterinaria (Nelson, 2010). La fructosamina mide el promedio de los niveles de glucosa en sangre durante aproximadamente 2-3 semanas y es usada en medicina veterinaria para monitorizar la eficacia del tratamiento de forma similar a la hemoglobina A1c en humanos (Nelson, 2010).

Los niveles normales de fructosamina correlacionaron con el retraso de la aparición de cataratas en ambos perros diabéticos debido al tratamiento con terapia génica. En los perros diabéticos que recibieron el tratamiento de terapia génica con AAV-Ins y AAV-Gck las cataratas fueron evidentes muchos años después de la inducción de diabetes, a los 8 y 9 años de edad en Dog1 y Dog2, respectivamente, edad similar a la que los perros Beagle sanos también desarrollan cataratas (Williams et al., 2004). De hecho, 9 de los 13 perros Beagle sanos de edad similar estabulados en las mismas instalaciones que los animales diabéticos tratados con AAV-Ins y AAV-Gck también desarrollaron cataratas. Por otra parte, se ha descrito un rápido desarrollo de cataratas en perros diabéticos tratados con insulina exógena, de los cuales el 80% desarrollan cataratas durante los 16 meses

posteriores al diagnóstico de la enfermedad (Beam et al., 1999). Previamente en nuestro laboratorio, habíamos observado que perros Beagle diabéticos alojados en las mismas instalaciones y tratados exclusivamente con insulina humana recombinante, desarrollaron cataratas a los 3-9 meses después de la inducción de diabetes (Callejas et al., 2013).

Además, durante el periodo de seguimiento de 8 años, los perros tratados con AAV-Ins y AAV-Gck mostraron niveles de colesterol y triglicéridos normales en suero. La hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia, junto con la hiperglucemia, constituyen factores de riesgo para la enfermedad cardíaca en pacientes diabéticos (Kannel et al., 1974; Patel et al., 2016). Los perros diabéticos no suelen desarrollar complicaciones a largo plazo de la diabetes (Nelson, 2010). Los únicos hallazgos comunes en medicina veterinaria son el desarrollo de cataratas y las infecciones del tracto urinario (Callejas., 2013; Nelson, 2010). Otras complicaciones a largo plazo de la diabetes tales como nefropatía, neuropatía, retinopatía o cardiomiopatía son infrecuentes en perros diabéticos. Este hecho y el reducido número de animales incluidos en este estudio de seguimiento a largo plazo nos impiden extraer conclusiones sólidas sobre la eficacia de nuestro tratamiento en la prevención del desarrollo de complicaciones secundarias de la enfermedad. Sin embargo, la normalización de la glucemia y de las alteraciones metabólicas sugeriría esta terapia muy probablemente podría prevenir el desarrollo de las graves complicaciones secundarias de la enfermedad en pacientes humanos.

Algunas de las aproximaciones de terapia génica previamente desarrolladas para contrarrestar la hiperglucemia diabética se basaron en la expresión de insulina regulada por glucosa en células no- β para responder a los cambios de glucosa en sangre (Alam et al., 2013; Burkhardt et al., 2005; Chen et al., 2001; Han et al., 2011; Kozlowski et al., 2007; Yang and Chao, 2003; Zhang and Dong, 2015). Tanto promotores endógenos como nuevos promotores híbridos han sido utilizados para lograr la expresión de insulina regulada por glucosa en tejidos extrapancreáticos, principalmente el hígado, tras la administración *in vivo* de vectores virales (Alam et al., 2013; Burkhardt et al., 2005; Chen et al., 2001; Han et al., 2011; Kozlowski et al., 2007; Yang and Chao, 2003; Zhang and Dong, 2015). Sin embargo, ninguna de estas aproximaciones ha logrado mimetizar la respuesta rápida a la glucosa del promotor endógeno de la insulina (Dong and Woo, 2001). Además, la lenta activación transcripcional de estos promotores podría resultar en una inadecuada

respuesta de secreción de insulina, con potencial desarrollo de episodios de hiperglucemia postprandial seguidos de hipoglucemia varias horas después.

En nuestra aproximación terapéutica, la enzima Gck, y no la insulina, es el componente que responde a los niveles de glucosa circulantes mediante la activación de la fosforilación de la glucosa cuando los niveles de glucosa sanguíneos son elevados. En las células musculares modificadas genéticamente, la expresión y secreción de niveles basales de insulina garantiza la translocación del transportador GLUT-4 a la membrana plasmática, por lo que el transporte de glucosa no se convierte en un paso limitante. La captación de glucosa se produce a continuación por la rápida fosforilación de grandes cantidades de glucosa por la enzima Gck, que se activa mientras los niveles de glucosa son altos y se inactiva cuando éstos se normalizan. Así, a pesar de la expresión constitutiva de insulina, el sistema responde a los niveles de glucosa circulante mediante la captación de glucosa en el músculo que se ve estimulada en condiciones de hiperglucemia, tal como en situación postprandial, pero deja de estar operativo progresivamente a medida que la glucemia vuelve a los niveles fisiológicos. La buena respuesta del sensor a los niveles de glucosa circulantes se evidenció al realizar el test oral de tolerancia a la glucosa. El pico de glucosa alcanzado en los perros tratados con AAV1-Ins y AAV1-Gck fue sustancialmente menor que el de los animales diabéticos no tratados, aunque ligeramente superior al de los perros sanos de edad similar. No obstante, la glucemia alcanzó valores de normalidad relativamente rápido en los perros tratados con AAV1-Ins y AAV1-Gck y 2 horas después de la sobrecarga del azúcar, la glucemia fue inferior a 200 mg/dl, un perfil considerado como no diabético según las directrices de la Asociación Americana de la Diabetes (*Standards of Medical Care in diabetes*, 2011). El hecho de que solo se requieran niveles muy bajos y constantes de insulina para mantener la normoglucemia, incluso después de una sobrecarga de glucosa, aumenta el perfil de seguridad de nuestra terapia y constituye una ventaja sobre el uso de promotores regulados por glucosa, con una cinética de respuesta lenta, para expresar insulina en tejidos extrapancreáticos. Anteriormente, en nuestro laboratorio, se había demostrado que los perros tratados con AAV1-Ins y AAV1-Gck no desarrollaron hipoglucemia a una edad más temprana, incluso cuando se sometieron a ejercicio intenso después de 24 horas de ayuno (Callejas et al., 2013). Asimismo, en el largo seguimiento de los animales realizado en esta tesis doctoral, tampoco se observaron episodios de hipoglucemia a medida que los animales envejecían y modificaban sus necesidades metabólicas, demostrando que el riesgo de hipoglucemia

con esta terapia génica es muy bajo. Además, la producción de niveles bajos y constantes de insulina media beneficios adicionales sobre el metabolismo. Hemos observado, tanto en ratones como en perros, que los bajos niveles de insulina producidos por las células musculares son suficientes para suprimir la producción hepática de glucosa, la lipólisis en el tejido adiposo y la cetoacidosis (Callejas et al., 2013; Mas et al., 2006). De hecho, los perros diabéticos tratados con AA1-Ins y AAV1-Gck de este estudio ganaron peso con la edad y mostraron un contenido normal de grasa.

Esta tesis doctoral presenta los datos de eficacia más duraderos tras la transferencia génica en un modelo animal grande de una enfermedad metabólica no-monogénica. De hecho, la eficacia más larga de un tratamiento experimental para la diabetes descrita hasta el momento se obtuvo tras el trasplante de islotes porcinos en perros y en primates no humanos, en los que se describió un buen control glucémico durante 1.8 años y 1.7 años, respectivamente (Gazda et al., 2014; Shin et al., 2015). Además, este trabajo también demuestra la adaptabilidad del “sensor de glucosa” compuesto por insulina y glucoquinasa a los cambios metabólicos asociados al envejecimiento así como la seguridad a largo plazo de la aproximación en animales grandes. Todos estos datos indican que esta aproximación de terapia génica posee un gran potencial para el tratamiento futuro de la diabetes en pacientes humanos.

Sin embargo, para la futura translación a la clínica, esta aproximación requiere una importante optimización adicional; en particular, la generación de un vector viral que codifique ambos genes. La administración de los vectores individuales AAV-Ins y AAV-Gck mediaba una distribución heterogénea de los mismos, de manera que diferentes fibras musculares podían presentar niveles variables de expresión de cada uno de los genes terapéuticos. La utilización de un único vector dual aseguraría la expresión conjunta de insulina y glucoquinasa en la misma célula, lo que mejoraría la eficiencia del sistema. Por otra parte, está ampliamente descrito que los posibles efectos de toxicidad derivados de la administración de vectores AAV incrementan con la dosis de vector administrada (Mingozzi and High, 2013). Por tanto, el desarrollo de un vector dual que codifique conjuntamente los genes de la insulina y de la glucoquinasa, permitiría reducir la dosis total de vector necesaria para conseguir el efecto terapéutico, lo que minimizaría los riesgos de toxicidad. Por otro lado, facilitaría el proceso de producción a gran escala de

los vectores AAV1 y reduciría su coste. Además, simplificaría los procesos regulatorios necesarios para una futura aplicación en pacientes humanos.

Aunque existen diversas aproximaciones que permiten co-exresar dos genes en un mismo vector viral tales como la inserción de una secuencia IRES o el péptido 2A (Ngoi et al., 2004; Szymczak-Workman et al., 2012), éstas no permiten modular independientemente los niveles de expresión de cada transgén. Como alternativa pueden disponerse dos *cassettes* de expresión en un mismo vector viral en dos unidades transcripcionales independientes con sus correspondientes elementos reguladores. Esta aproximación es la más versátil ya que permite la combinación de diferentes elementos en cada transgén con el fin de optimizar individualmente la expresión de cada uno de ellos. Además, la utilización de elementos reguladores diferentes permite evitar incluir en el *cassette* de expresión secuencias repetidas que podrían dar lugar a eventos de recombinación en el vector viral. En este estudio se utilizaron inicialmente los promotores CMV y RSV para dirigir la expresión de la insulina y la glucoquinasa, respectivamente. Estos promotores han sido ampliamente utilizados ya que median niveles de expresión robustos en la mayoría de tipos celulares (Papadakis et al., 2004; Powell et al., 2015). Asimismo, la señal de poliadenilación también influencia de forma decisiva los niveles de expresión obtenidos, siendo las utilizadas en este estudio, SV40 y bGH, dos de las más ampliamente descritas y que presentan un tamaño reducido (Papadakis et al., 2004; Powell et al., 2015). Las combinaciones de estos promotores y señales de poliadenilación permitieron obtener elevados niveles de expresión tanto de insulina como de glucoquinasa *in vitro*. Sin embargo, la inclusión del promotor CMV completo dio lugar a constructos AAV duales con un tamaño de 4.7 kb o ligeramente superiores. Aunque el límite teórico de encapsidación de los vectores AAV1 es de 4.7 kb, en nuestro laboratorio hemos podido producir de forma eficiente vectores de otros serotipos de tamaño igual o superior a 4.7 kb. Sin embargo, en este trabajo los vectores AAV1 con tamaño ligeramente superior o igual a 4.7 kb se produjeron con baja eficiencia, lo que indicaría que además del tamaño, la composición del transgén también determina la encapsidación de los vectores AAV. El uso de una versión reducida del promotor CMV, el promotor miniCMV, permitió disminuir el tamaño de los constructos y producir vectores AAV1 duales con un rendimiento elevado, similar al obtenido en la producción de otros muchos vectores AAV en nuestro laboratorio.

Entre los diferentes vectores duales, aquellos con las unidades transcripcionales en conformación opuesta mediaron mayores niveles de expresión de insulina y glucoquinasa que el resto de combinaciones, debido posiblemente a que la orientación divergente de los promotores impediría interferencias entre las dos unidades de expresión génica. Además, los análisis *in vivo*, tanto en ratones sanos como diabéticos, demostraron mayor eficacia terapéutica de los vectores duales en comparación con los vectores individuales. Este hecho estaría relacionado con el efecto sinérgico obtenido al expresar conjuntamente la insulina y la glucoquinasa en la misma célula a partir de los vectores duales, evitando la heterogenicidad producida por la utilización de dos vectores individuales. Específicamente, los ratones diabéticos tratados con el vector dual en el que la unidad transcripcional miniCMV-insulina-SV40 estaba dispuesta en conformación opuesta a la unidad RSV-glucoquinasa-bGH (vector dual L) mostraron valores normales de glucemia en ayuno y tolerancia a la glucosa indistinguible a la de los animales sanos.

En conclusión, los datos obtenidos en las dos partes de este trabajo demuestran la funcionalidad y seguridad a largo plazo de la administración intramuscular de los vectores AAV que codifican insulina y glucoquinasa para contrarrestar la diabetes y sientan las bases para una futura translación a la clínica de una estrategia de terapia génica utilizando un único vector AAV dual que exprese ambos genes.

VI. CONCLUSIONES

PARTE 1: Eficacia y seguridad a largo plazo de la terapia génica para diabetes tipo 1 con insulina y glucoquinasa

1. El tratamiento de terapia génica con AAV1-Ins y AAV1-Gck en perros diabéticos demostró ser eficaz incluso 8 años tras la administración de los vectores. Así, se observó normalización de la glucemia, de la insulinemia y del peso corporal a lo largo de este periodo.
2. Durante todo el seguimiento de 8 años, los perros diabéticos tratados con AAV1-Ins y AAV1-Gck mostraron un buen control glucémico con niveles de fructosamina dentro del rango de normalidad. También, presentaron niveles séricos de triglicéridos y colesterol normales.
3. Tras 8 años de tratamiento con AAV1-Ins y AAV1-Gck, los perros diabéticos presentaban una pérdida de más del 95% de las células β pancreáticas, pero una adecuada tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa, indicando así, la eficacia del “sensor de la glucosa” del músculo esquelético en el control de la homeostasis de la glucosa.
4. El tratamiento a largo plazo con AAV1-Ins y AAV1-Gck no produjo signos patológicos en el músculo esquelético, como inflamación o acúmulos anormales de glucógeno.
5. Ocho años después de la administración de la terapia génica se detectaron genomas virales de AAV1-Ins y de AAV1-Gck en la mayoría de las biopsias de los músculos esqueléticos cuádriceps y tibiales en ambos perros.
6. Además, se detectó expresión de insulina y glucoquinasa en la mayoría de dichas biopsias y no se detectó expresión de los transgenes en las muestras de hígado.
7. A los 8 años del tratamiento, la detección de actividad glucoquinasa en el músculo esquelético e insulina humana en suero confirmaron la persistencia del sistema terapéutico a largo plazo.
8. En conjunto, estos resultados demostraban la eficacia y seguridad a largo plazo tras una única administración de terapia génica con AAV1-Ins y AAV1-Gck y establecían las bases para la futura translación de esta aproximación para el tratamiento de la diabetes mellitus en pacientes humanos.

PARTE 2: Generación de un vector adeno-asociado de serotipo 1 (AAV1) dual para la expresión conjunta de insulina y glucoquinasa

1. Se diseñaron y produjeron diferentes constructos AAV duales que contenían los genes de la Insulina y de la glucoquinasa bajo el control de diferentes elementos reguladores. No obstante, únicamente aquellos de tamaño alrededor de 4 kb permitieron generar vectores AAV1 a títulos elevados.

2. Los niveles de expresión del gen de la insulina y de la glucoquinasa humanas, fueron mayores en células transfectadas con los plásmidos duales (pAAV-hIns-hGck) que en aquellas células transfectadas conjuntamente con los plásmidos individuales (pAAV-hIns y pAAV-hGck).

3. De las diferentes conformaciones evaluadas *in vitro*, los constructos duales con las unidades transcripcionales orientadas hacia el exterior (de manera reversa) resultaron en mayores niveles de expresión de los dos genes terapéuticos, destacando el “L” como el mejor constructo.

4. Los ratones sanos y diabéticos tratados con el vector AAV1 dual “L” mostraron mayores niveles de expresión de insulina y glucoquinasa en músculo esquelético, y una mejor tolerancia a la glucosa que los animales tratados con la combinación de los respectivos vectores individuales.

5. En conclusión, el vector dual “L”, que utiliza una combinación de la unidad transcripcional miniCMV-insulina-poliASV40 en conformación opuesta al RSV-glucoquinasa-poliAbGH, presentó mejor eficacia terapéutica en ratones diabéticos. Por tanto, podría considerarse el vector de elección para una futura traslación hacia la clínica de la aproximación de terapia génica con insulina y glucoquinasa.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Animales

1.1.1. Ratones

En los estudios de esta tesis doctoral se utilizaron ratones ICR (Harlan Tekland, Barcelona, España) machos de 8 semanas. Los ratones se estabularon en una instalación libre de patógenos (SER-CBATEG), en condiciones de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) y luz controladas (ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), y alimentación *ad libitum*, es decir, sin restringirles el acceso a la comida, con una dieta estándar (2018S Tekland Global; Envigo, Madison, Wisconsin, EEUU). Para la toma de muestras, los animales se anestesiaron mediante anestésicos inhalatorios (Isoflurano, IsoFlo[®], Abbott Animal Health, Illinois, EEUU) y fueron eutanasiados por decapitación. Las muestras de sangre y tejidos fueron tomadas por la mañana e inmediatamente fueron congeladas con N₂ líquido y guardadas a -80°C . Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el *Comitè d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (CEEAH).

1.1.2. Perros

En los estudios realizados en esta tesis doctoral también se utilizaron perros machos de raza Beagle que fueron adquiridos en Isoquimen (Sant Feliu de Codines, España) y estabulados en el *Servei de Granges i Camps Experimentals* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB). Los animales se alimentaron individualmente una vez al día a las 9 de la mañana con 30 g/kg de peso con pienso estándar (Nestle). Los perros fueron monitorizados regularmente en el *Hospital Clínic Veterinari* de la UAB. Los estudios fueron realizados en colaboración con el Dr. Félix García y la Dra. Anna Andaluz del *Departament de Medicina i Cirurgia Animal* de la Facultad de Veterinaria de la UAB, que estuvieron involucrados en todos los procedimientos experimentales, incluyendo la inyección de los vectores, la realización de biopsias y la eutanasia de los animales. El Dr. Rafael Ruiz de Gopegui del *Departament de Medicina i Cirugía Animal* de la Facultad de Veterinaria de la *Universitat Autònoma de Barcelona* supervisó regularmente la salud de los animales durante los procedimientos. Con este fin, los animales fueron sometidos a un examen clínico completo que incluyó radiografía de tórax, evaluación ecográfica,

electrocardiograma, examen oftalmológico, urianálisis, hematología y bioquímicas completas. Regularmente, durante los procedimientos, los animales fueron sometidos a exámenes físicos, revisiones oftalmológicas y urianálisis. Hematología trimestralmente y bioquímica sérica mensualmente. Los animales fueron sacrificados mediante una administración letal de fenobarbital. Las muestras de tejidos fueron tomadas e inmediatamente fueron conservadas en formol o congeladas con N₂ líquido y guardadas a -80°C. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por *el Comité d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana de la UAB (CEEAH)*.

1.2. Cepas bacterianas

Las cepa *E.coli XL2Blue* (Stratagene-Agilent technologies, Santa Clara, CA, EEUU) se utilizó para obtener los diferentes constructos plasmídicos utilizados en este trabajo. Todos los plásmidos contenían el gen de selección de resistencia a ampicilina. El cultivo bacteriano se hizo crecer en medio LB sólido o líquido (miller's LB Broth, Conda, Madrid, España) con 2% de agar y 50 µg/mL de ampicilina.

1.3. Oligonucleótidos y sondas

Los oligonucleótidos y sondas usados para el análisis por Q-PCR se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 4. Oligonucleótidos y sondas.

Gen	Secuencia forward	Secuencia reverse	Sonda
hIns	5'-GTC CTG GGT GTG TAG AAG AAG-3'	5'-CTT TGT GAA CCA ACA CCT GTG-3'	5'-TCG TTC CCC GCA CAC TAG GTA GA-3'
rGck	5'-TGT CAA GGA AGT CAG AGA TGC-3'	5'-ATG CTG GTC AAA GTG GGA G-3'	5'-AGG GCA GTG GAG CGT GAA GAC-3'
hGck	5'-ATT GTT CCC TTC TGC TCCT G-3'	5'-GCT TCA CCT TCT CCT TTC CTG-3'	5'-TGC CCT TAT CGA TGT CTT CGT GCC-3'
<i>H36B4</i>	5'-CTC TGG AGA AAC TGC TGC CT-3'	CTG CAC ATC CAG GAT TTC AA-3'	-
m36B4	5'-TCC CAC CTT GTC TCC AGT CT-3'	5'-ACT GGT CTA GGA CCC GAG AAG-3'	-
<i>RplpO</i> canino	5'-ACC TCT TTC TTC CAG GCT TTA G-3'	5'-CCA CTT TGT CTC CCG TCT TAA T-3'	5'-ACC ATT GAA ATC TTG AGT GAT GTG CAG C-3'

1.4. Plásmidos

A continuación, se presenta en la tabla 5 los plásmidos generados para la realización de este trabajo.

Tabla 5. Plásmidos generados.

Nombre	Promotor	Gen de interés	PoliA
CMV-null	CMV	-	SV40
CMV- hIns	CMV	Insulina humana	SV40
CMV-rGck	CMV	Glucoquinasa de rata	SV40
A: RSV-rGck-CMV-hIns	RSV	Glucoquinasa de rata	SV40
	CMV	Insulina humana	SV40
B: CMV-hIns	CMV	Insulina humana	SV40
C: RSV-rGck	RSV	Glucoquinasa de rata	SV40
D: CMV-hIns-RSV-hGck	CMV	Insulina humana	SV40
	RSV	Glucoquinasa humana	bGH
E: RSV-hGck-CMV-hIns	RSV	Glucoquinasa humana	bGH
	CMV	Insulina humana	SV40
F: CMV-hIns(rev)-RSV-hGck	CMV	Insulina humana	SV40
	RSV	Glucoquinasa humana	bGH
G: RSV-hGck-CMV-hIns(rev)	RSV	Glucoquinasa humana	bGH
	CMV	Insulina humana	SV40
H: CMV-hIns	CMV	Insulina humana	SV40
I: RSV-hGck		Glucoquinasa humana	bGH
J: miniCMV-hIns-RSV-hGck	miniCMV	Insulina humana	SV40
	RSV	Glucoquinasa humana	bGH
K: RSV-hGck-miniCMV-hIns	RSV	Glucoquinasa humana	bGH
	miniCMV	Insulina humana	SV40
L: miniCMV-hIns(rev)-RSV-hGck	miniCMV	Insulina humana	SV40
	RSV	Glucoquinasa humana	bGH
M: RSV-hGck-miniCMV-hIns(rev)	RSV	Glucoquinasa humana	bGH
	miniCMV	Insulina humana	SV40
N: miniCMV-hIns	miniCMV	Insulina humana	SV40
I: RSV-hGCK	RSV	Glucoquinasa humana	bGH

CMV: promotor del citomegalovirus humano, RSV: promotor del Virus del Sarcoma de Rous, SV40: señal de poliadenilación del simian virus 40, bGH: señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bobina.

1.5. Reactivos

Los reactivos de biología molecular se obtuvieron de las casas comerciales Roche (Roche Diagnostics corp., IN, EEUU), Invitrogen Corporation (actualmente 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, España), Qiagen (Hilden, Alemania), QBIogen (actualmente MP Biomedicals) (Irvine, CA, EEUU) y Fermentas (St. Leon-Rot, Alemania). Los medios de cultivo y el antibiótico se obtuvieron de PAA (Paching, Austria) y el suero (FBS) y el plurónico de Gibco (Invitrogen, Life Technologies).

2. MÉTODOS

2.1. Técnicas básicas de DNA

2.1.1. Preparación del DNA plasmídico

Para obtener pequeñas cantidades de DNA plasmídico (3-4 μg) se realizaron minipreparaciones (*minipreps*) según el protocolo de lisis alcalina originariamente descrito por Birnboim (Birnboim and Doly, 1979). A partir de 1.5 mL de medio de cultivo (LB con el antibiótico correspondiente) se degrada la pared bacteriana por acción de la enzima lisozima, seguida de una lisis alcalina y de la precipitación selectiva del DNA genómico y proteínas desnaturizantes con una solución de acetato de potasio a pH ácido. El RNA bacteriano se degrada por la adición de la enzima RNAsa.

Por otro lado, para obtener grandes cantidades de DNA se realizaron maxipreparaciones (*maxipreps*), a partir de las cuales se obtiene como máximo 1 mg de plásmido de DNA, megapreparaciones (*megaprep*) para obtener un máximo de 2.5 mg, gigapreparaciones (*gigaprep*) para obtener un máximo de 10 mg a partir de 200, 500 ó 2500 mL de medio de cultivo, respectivamente. Este método se basa igualmente en la lisis alcalina, pero la purificación de DNA se realiza mediante columnas de absorción *Pure Yield™ Plasmid MaxiPrep System* (Promega Corporation) para las *maxipreps*, *EndoFree Plasmid Mega kit* (Qiagen) para las *megapreps* y *EndoFree Plasmid Giga kit* (Qiagen) para las *gigapreps*.

2.1.2. Digestión del DNA con enzimas de restricción

Cada enzima de restricción necesita unas condiciones de reacción específicas de pH, fuerza iónica y temperatura. Se siguieron las instrucciones de la casa comercial de cada enzima utilizada (New England Biolabs, Roche, Promega o Fermentas). En general, el DNA fue digerido con una unidad de enzima por μg de DNA en el tampón suministrado por el fabricante durante una hora a la temperatura óptima de cada enzima. El producto de la reacción se analizó en geles de agarosa. Cuando el DNA tuvo que digerirse con dos o más enzimas de restricción, las digestiones se llevaron a cabo conjuntamente siempre que las condiciones del tampón y temperatura fueran compatibles. Si las enzimas tenían

diferentes requerimientos, después de la primera digestión se purificó el DNA de las sales y de la enzima mediante *GeneJET®Gel Extraction Kit* (Thermo SCIENTIFIC) según las instrucciones del fabricante. El DNA fue eluido en 30 μ L con el tampón de elución suministrado por el fabricante.

2.1.3. Defosforilación de fragmentos de DNA

Una vez digerido el DNA plasmídico, se puede volver a re-ligar. Este proceso se puede evitar mediante la eliminación de los residuos fosfato del extremo 5' del vector. Para la defosforilación se utilizó una unidad de fosfatasa alcalina por cada 1-5 μ g de DNA (*FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Fermentas) en el tampón comercial a 1X. La reacción de defosforilación se realizó durante 10 minutos a 37°C y se inactivó la enzima a 74°C durante 5 minutos para evitar alteraciones de la fosfatasa en la reacción de la ligación.

2.1.4. Generación de extremos romos de fragmentos de DNA

En los casos donde la acción de la enzima de restricción dejó los extremos cohesivos y se necesitaba extremos romos para el clonaje, al fragmento digerido se le añadió la enzima *Klenow Fragment* (Fermentas). En presencia de la doble cadena de DNA y de deoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs), la DNA polimerasa rellena el extremo generado por la enzima de restricción protuberante (actividad polimerasa 5' \rightarrow 3' o 3' \rightarrow 5'). La reacción se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

2.1.5. Ligación: Construcción de moléculas híbridas

La construcción de moléculas híbridas de DNA a partir de diferentes fragmentos se llevó a cabo con ayuda de la enzima ligasa. Los fragmentos del DNA de interés se mezclaron a diferentes ratios molares de vector e inserto (1:2, 1:5, 1:10) con la enzima DNA Ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs) y el tampón correspondiente según el protocolo establecido por la casa comercial. Los productos resultantes de la ligación se transformaron en células competentes *E.coli* de la cepa XL2-blue (Stratagene-Agilent technologies, Santa Clara, CA, EEUU).

2.1.6. Transformación en células competentes *E.coli* XL2-blue

Se introdujo el plásmido de DNA en las células bacterianas competentes mediante electroporación. Se emplearon 40 µL de células *E.coli*XL2-blue (2×10^{10} células/mL), que se descongelaron previamente en hielo y se les añadió 1 µL (aproximadamente 10 ng) de la reacción de la ligación del DNA o del DNA control directamente a las células competentes. Seguidamente a la incubación en hielo durante 5 minutos, las células fueron electroporadas a 2500 V con un electroporador (Bio-Rad). Posteriormente, se diluyeron en 100 µL de LB, se sembraron en placas de LB con ampicilina y se incubaron a 37°C O/N (durante toda la noche). A la mañana siguiente se hicieron crecer las colonias de bacterias obtenidas en minicultivos con LB y posteriormente se realizó extracción del DNA de las colonias. Y finalmente, se analizó la presencia de moléculas híbridas de DNA mediante enzimas de restricción.

2.1.7. Separación y visualización de fragmentos de DNA

El gel de electroforesis de agarosa es el método estándar utilizado para separar, identificar y purificar los fragmentos de DNA. Para separar los fragmentos de DNA entre 0.2 y 7 Kb se utilizaron geles de agarosa al 1%. Para separar fragmentos de menos de 0.2 Kb se utilizaron geles de agarosa al 2%. Se añadieron bajas concentraciones de Bromuro de Etidio al gel (0.5 µg/mL) para poder visualizar el DNA en el gel, ya que el Bromuro de Etidio se intercala entre las dos cadenas del DNA. La presencia de DNA se visualizó mediante luz ultravioleta (UV) de baja longitud de onda (310nm) a través de un transiluminador y un sistema de cámaras (Syngene). Como marcadores de peso molecular se utilizaron el *GeneRuler* 1 Kb y/o *GeneRuler* 100 pb (Thermo Scientific).

Los geles de agarosa se prepararon disolviendo agarosa en tampón de electroforesis 1X TAE (Trisacetate pH 8.3, 40 mM y EDTA 1 mM) con 0.5 µg/mL de Bromuro de Etidio. Las muestras se cargaron en el gel con 1X de tampón de carga (Fermentas) y corrieron con el tampón de electroforesis 1X TAE a 100 V. Una vez separadas las bandas de la digestión, se recortaron los fragmentos de interés y se purificó el DNA de éstos mediante *GeneJET™Gel Extraction kit* (Fermentas). El DNA se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU).

2.2. Células eucariotas en cultivo

2.2.1. Células HEK293

Las células HEK293 son células embrionarias de riñón humano que presentan el gen adenoviral E1 del Ad5 integrado de forma estable en el genoma celular. Estas células se utilizaron para amplificar los vectores virales y para la comprobación *in vitro* de la expresión de los plásmidos generados. Se mantuvieron en un medio de cultivo DMEM (PAA) con 2mM de Glutamina, suplementados con FBS al 10% (inactivado por calor) en un incubador ajustado al 8.5 % de CO₂ y a 37°C. Cuando estas células tenían una confluencia del 70 % fueron tripsinizadas y plaqueadas a diferentes diluciones.

2.2.2. Transfección de DNA en células en cultivo

Para realizar el análisis de expresión *in vitro* de los constructos obtenidos se realizaron transfecciones de los plásmidos en células HEK293. Utilizamos la técnica de transfección con Lipofectamina (LipofectamineTM2000, Invitrogen), la cual se basa en la formación de un complejo Lipofectamina-DNA con el fin de favorecer la entrada del DNA plasmídico en la célula. La proporción de Lipofectamina-DNA utilizada fue de 10 µL de Lipofectamina (1 mg/mL) por cada 4 µg de DNA para placas de 6 pozos. En el momento de la transfección las células HEK293 estaban entre el 70-80 % de confluencia. El cultivo se paró a las 24-48h horas post-transfección para analizar las muestras.

2.3. Producción, purificación y titulación de los vectores virales adenoasociados

2.3.1. Producción y purificación

Las partículas infectivas de vectores virales AAV1 se generaron en cultivos celulares HEK293 cultivados en *Roller Bottles* (RB) mediante un protocolo de triple transfección (Ayuso et al., 2010) en el que se utilizan tres plásmidos (el plásmido con el gen de interés, el plásmido con los genes *Rep* y *Cap* y el plásmido pWEAD). Este protocolo se basa en la precipitación de los virus mediante polietilenglicol (PEG) y ultracentrifugación con gradientes de CsCl, que permite eliminar prácticamente el contenido de las cápsides vacías y disminuir las impurezas proteicas, aumentando de esta forma la pureza de la preparación

viral final, para así tener unos resultados de niveles de transducción *in vivo* más elevados (Ayuso et al., 2010).

La co-transfección de cada RB se realizó en 30 mL de fosfato cálcico con 150 µg del DNA plasmídico de interés (con las secuencias ITR y el *cassette* de expresión correspondiente), juntamente con 150 µg del plásmido accesorio rep2/cap1 (plásmido de expresión codificante por las proteínas de la cápside proteica de las partículas virales y para las proteínas necesarias para la replicación viral) y 150 µg del plásmido *helper* pWEAD (plásmido de expresión codificante para las proteínas adenovirales necesarias).

A las 48 horas de la transfección, se recogieron y centrifugaron las células a 250 g durante 10 min. El medio de cultivo se guardó a 4°C. El *pellet* celular se reconstruyó en TMS (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 8) y se sonicó para lisar las células y liberar los vectores virales de su interior. El lisado se centrifugó a 2500 g durante 30 min, y el sobrenadante de esta centrifuga se añadió al medio de cultivo previamente guardado a 4°C. A continuación, las partículas virales se precipitaron mediante una incubación de 15h en PEG 8000 al 8% (Sigma) a 4°C. Pasado este periodo, los vectores se precipitaron por centrifugación a 4000 g durante 30 min. Este nuevo *pellet*, el cual contenía los vectores virales del medio de cultivo y de las células, se reconstituyó con TMS, se trató con benzonasa (Merck) durante 1h a 37°C y finalmente se centrifugó a 10000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se cargó en tubos de 37.5 mL *Ultra clear* (Beckman) que contenían un gradiente discontinuo de CsCl de densidad 1.5 (5 mL) y 1.3 g/mL (10mL). A continuación, se centrifugaron durante 17h a 27000 rpm en un rotor SW28 (Beckman). Las bandas de AAV fueron recogidas mediante agujas de 18 G y se transfirieron a tubos *Ultra clear* de 12.5 mL. El resto del tubo de 12.5 mL se llenó con CsCl a 1.379 g/mL con el fin de generar un gradiente continuo. Estos tubos se centrifugaron a 38000 rpm en un rotor SW40Ti (Beckman) durante 48h. Finalmente, se recogieron y dializaron las bandas correspondientes a las partículas virales llenas mediante una membrana de 10KDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Products*, Pierce), y posteriormente se filtraron con filtros de 0.22 µm (Milipore).

2.3.2. Titulación de genomas virales

Los genomas virales de los AAV1 se determinaron por PCR cuantitativa adecuando el protocolo descrito para el AAV2 *Reference Standard Material* (Lock et al., 2010) a los vectores utilizados en este estudio. La cuantificación de cada vector se hizo paralelamente con un vector de referencia de concentración conocida para garantizar la validez de los resultados. Como curva estándar se utilizó un plásmido linearizado y cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm.

Para asegurarnos de que el título del vector viral no se sobreestimaba debido a la presencia de plásmidos de DNA restantes de la transfección en la preparación final, se realizó un tratamiento con DNAsa previo a la cuantificación. Solo los genomas encapsidados son resistentes a la digestión con DNAsa. Se añadieron 5 μL de cada preparación del vector viral en 5 μL de tampón de DNAsa (10U/ μL) y 36 μL de agua Mili-Q. La digestión se incubó durante 60 min a 37°C. Después de la digestión, las muestras se diluyeron para obtener un valor de amplificación dentro del rango de la curva estándar.

La reacción de cuantificación consistió en una incubación inicial de 10 min a 95°C (que permite la activación de la polimerasa y la desnaturalización de las cápsides virales, permitiendo la liberación de los genomas), seguida de 40 ciclos de 30 s a 95°C (desnaturalización) y 30 s a 60°C (*annealing* y elongación).

Cada reacción TaqMan contenía un volumen final de 10 μL :

Reacción TaqMan
5 μL <i>TaqMan LightCycler®480 Probe Master</i>
0.2 μL <i>primer forward</i> (10 μM)
0.2 μL <i>primer reverse</i> (10 μM)
0.1 μL sonda (10 μM)
2 μL H ₂ O Mili-Q
2.5 μL vector diluido

2.3.3. Cuantificación de las partículas virales por tinción de plata

El análisis de las preparaciones virales por electroforesis de proteínas SDS-PAGE y la posterior tinción con nitrato de plata permite la cuantificación de las cápsides virales, que comparado con el valor de genomas virales obtenidos por RT-PCR, permite calcular el porcentaje de cápsides vacías en cada preparación (relación: partículas virales/ genomas virales). Además, este protocolo permite visualizar en el gel el grado de contaminación de proteínas no virales que podrían afectar a la eficiencia de transducción *in vivo*.

El volumen apropiado del vector de interés, del vector de referencia (control utilizado también para cuantificar por RT-PCR) y de diferentes diluciones del vector K208 (de concentración conocida y utilizado como curva estándar), se mezclaron con el tampón 4x *Novex® Tris-Glycine LDS Sample Buffer* (Invitrogen) y 10X *NuPAGE Sample Reducing Agent* (Invitrogen) hasta llegar a un volumen final de 20 µL. Después de 5 minutos en ebullición, las muestras se cargaron en un gel del 10 % *Bis-Tris Gel 1.5mm 15 well* (Invitrogen) y se dejaron correr a 120 V durante 2 horas. Las proteínas del gen se fijaron con una mezcla de H₂O Mili-Q/etanol/ácido acético. A continuación, el gen se sensibilizó con una mezcla de Na₂S₂O₃/Acetato de sodio/etanol/H₂O Mili-Q. Finalmente, el gel se tiñó con nitrato de plata y las bandas se revelaron haciendo servir una mezcla de Na₂CO₃/Formaldehído/ H₂O Mili-Q.

El título de partículas virales se obtuvo por densitometría. A partir de la intensidad de la VP3 de cada dilución del vector K208 se generó una curva estándar para cuantificar las partículas virales de las diferentes preparaciones.

2.4. Administración intramuscular de los vectores virales AAV

2.4.1. Administración intramuscular de AAV en ratones

Los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de Ketamina (100 mg/Kg) (*Imalgene500®*, Merial, Barcelona, España) y xilacina (10 mg/Kg) (*Rompun®*, Bayer, Leverkusen, Alemania) para poder inyectarles los AAV1 en el músculo esquelético. Ambas extremidades posteriores se afeitaron para inyectar fácilmente los músculos *tibialis cranialis*, *gastrocnemius* y *quadriceps femoris*. Se inyectaron 30 µL de una solución que contenía la dosis requerida de AAV1 diluida con 0.001% Plurónico F68 (Gibco, Invitrogen,

Life Technologies) con una jeringa de 0.5 mL de insulina (B.Braun, Melsungen, Alemania) acoplada a una aguja de 30 G. Una vez inyectados los ratones fueron devueltos a sus jaulas.

2.4.2. Administración intramuscular de AAV en perros

Los perros Beagle descritos en esta tesis doctoral fueron tratados por (Callejas et al., 2013). A los animales se les administró el vector AAV1 en un total de 12-25 sitios en la cara lateral del muslo (con discos de mesoterapia con 5 agujas) y la cara craneolateral de la pierna (*tibialis cranialis*, con inyecciones de un solo punto con jeringas de insulina) de ambas extremidades posteriores, con una dosis máxima de vector por sitio de 6×10^{11} Vg (**Fig.22**).

En primer lugar, se premedicaron los animales con una inyección intramuscular de butorfanol (Turbogestic, Zoetis, España) a una dosis de 0.4 mg/kg. Seguidamente se les colocó un catéter (Vasocan®, B. Braun, Sheffield, Reino Unido) en la vena cefálica para administrar los fármacos anestésicos. La anestesia se indujo con una inyección intravenosa de Propofol (Propovet®, B. Braun, Sheffield, Reino Unido) a una dosis de 4 mg/Kg y una inyección intravenosa de Diazepam (Valium®, F. Hoffmann-LA Roche, Basilea, Suiza) a una dosis de 0.5 mg/Kg. A continuación, se intubó al animal y se mantuvo la anestesia con la inhalación de vapor de isoflurano al 2% con oxígeno (150 mL/Kg/min) en un sistema de respiración semi-abierto Bain. Una vez anestesiado el animal, se le afeitó toda el área de inyección de las dos extremidades posteriores.

Para las inyecciones en la cara lateral del muslo, los vectores virales se diluyeron en volúmenes de 2.5 mL de $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{PBS}$ hasta alcanzar la cantidad total de la dosis requerida (1×10^{12} vg/kg de cada vector). Las inyecciones se realizaron con una jeringa acoplada a un sistema de 5 agujas Meso-relle® (Biotekne SRL, Bologna, Italia) con un volumen de 0.5 mL por sitio de inyección (**Fig. 29a**). Para las inyecciones en la cara craneolateral de la pierna, los vectores virales se diluyeron en volúmenes de 1 mL de $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{PBS}$ hasta que se alcanzó la cantidad total de la dosis requerida, usando jeringas de insulina de 1 mL acoplada a una aguja de 30 G (B. Braun, Melsungen, Alemania) (**Fig. 29b**).

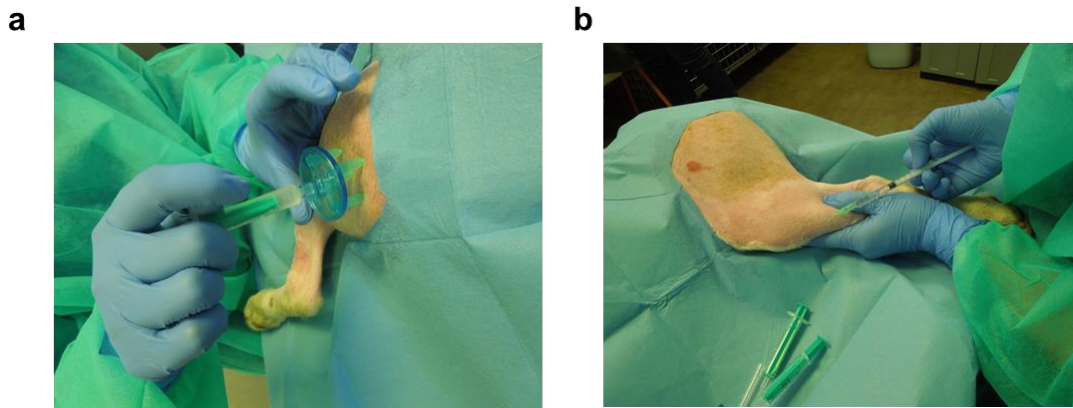


Figura 29. Administración intramuscular de vectores AAV en perros Beagle. (a) Inyección en la cara lateral del muslo con los discos de 5 agujas. **(b)** Inyecciones en *tibialis cranealis* con jeringas de insulina de 1 mL.

2.5. Inducción experimental de diabetes tipo 1

2.5.1. Inducción experimental de diabetes en ratones

Para inducir experimentalmente la diabetes, se administró a ratones de 8 semanas de edad, durante 5 días consecutivos, una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma, ST. Louis, Missouri, EEUU) a una dosis de 40 mg/Kg de peso corporal disuelto en 0.1 mol/l de citrato (pH 4.5) inmediatamente antes de la administración. La diabetes se evaluó midiendo los niveles de glucosa en sangre en alimentación con glucómetros Elite (Bayer, Lerverkusen, Alemania) una semana después de la última dosis de estreptozotocina. Se consideró a los animales diabéticos cuando éstos mostraron dos días consecutivos glucemias por encima de 250mg/dl.

2.5.2. Inducción experimental de diabetes en perros

A los animales se les indujo la diabetes a la edad de 10 meses (Callejas et al., 2013) mediante la inyección intravenosa de estreptozotocina (35 mg/kg) y aloxana (40 mg/Kg) (Sigma, St. Louis, MO) (Andersonl, 1993), preparada en tampón citrato trisódico a 100 mM, pH 4.5. Las soluciones se realizaron a una concentración de 100 mg/mL y se esterilizaron a través de filtros de 0.22 mm. La solución se preparó poco antes de la administración ya que es inestable una vez que está disuelta.

Para la inducción de la diabetes, se les colocó a los animales un catéter en la vena cefálica para la administración de los fármacos. Durante esta etapa los perros no pudieron

ingerir alimento, pero sí agua; los animales tuvieron un ayuno de al menos 12 horas antes de administrarles los fármacos.

A las 8 horas de la administración de los fármacos inductores de diabetes, empezaron a aparecer episodios de hipoglucemia que duraron más de 8 horas. Durante este tiempo, la glucemia se midió cada hora y el animal recibió por infusión intravenosa suero glucosado al 5% y cuando fue necesario un bolo de glucosa al 50% para contrarrestar la hipoglucemia aguda. Es muy importante realizar controles glucémicos para controlar que la glucemia no sea muy elevada, ya que si se sostiene durante varios días puede producir cetoacidosis. Los análisis bioquímicos son muy importantes en esta etapa y se realizaron varios la primera semana de inducción para valorar la evolución de los parámetros renales (creatinina, urea y fósforo) así como los parámetros pancreáticos (amilasa y lipasa) para detectar una posible pancreatitis aguda y por último para los parámetros hepáticos (AST y ALT) aunque el daño hepático pocas veces es un problema durante este procedimiento, ya que el hígado tiene una alta capacidad regenerativa y los valores alterados normalmente vuelven a la normalidad en pocos días. La pancreatitis aguda y el daño renal requieren de atención veterinaria urgente. Por lo general, la pancreatitis aguda puede resolverse en pocos días, pero el daño renal a veces permanece como un daño permanente o deriva en una insuficiencia renal y en muerte a corto plazo.

Entre las 24-48 horas después de la inducción, los niveles de glucosa en sangre de los perros comenzaron a elevarse. Siguiendo los principios de la *American Diabetes Association*, se diagnosticó diabetes mellitus cuando al realizar un test oral de tolerancia a la glucosa se tuvieron valores de glucemia superiores a 200 mg/dl a las dos horas de la sobrecarga oral.

2.6. Biodistribución de los vectores AAV

Los tejidos fueron digeridos durante toda una noche (overnight) en Proteinasa K (0.2 mg/ml). El DNA total fue aislado con MasterPureDNA Purification kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). El número de copias de genomas virales (Vg) fue determinado en 20 ng de DNA genómico por TaqMan qPCR con primers y sondas específicos para hIns y rGck descritos en la tabla 3. Vg/muestra se extrapoló de una curva estándar construida a partir de diluciones seriadas del plásmido linearizado que contienen la secuencia diana en 20 ng de DNA.

2.7. Expresión del transgén

El RNA total se extrajo de los diferentes tejidos usando Tripure® isolation reagent (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) en los tejidos procedentes de ratones y perros y usando RLT más β -mercaptoetanol (Sigma, St.Louis, Missouri, EEUU) en las células HEK293 y el Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). El RNA total (1 μ g) fue retrotranscrito usando el Transcriptor First Strand Synthesis Kit (Roche). Se realizó una qPCR cuantitativa en tiempo real en un LightCycler® 480 II (Roche) usando LightCycler® 480 probes Master (Roche). Los primers y sondas específicos utilizados se describen en la tabla 4. En ratones y células HEK293 se utilizó primers y sondas para analizar hIns y hGck, mientras en perros se utilizaron hIns y rGck. Los resultados fueron normalizados por la expresión de *Rplp0* usando primers específicos para ratones (m36B4), para células HEK293 (h36B4). En perros se utilizaron primer y sonda específicos *Rplp0* canino.

2.8. Morfología y Análisis Inmunohistoquímico

Las muestras fueron fijadas en 10% formalina, incluidas en parafina y seccionadas. El área de célula β se calculó a partir de tres secciones separadas 200 μ m marcadas con insulina, dividiendo el área de todas las células de insulina⁺ de cada sección entre el área total de la sección correspondiente utilizando un analizador de imagen (analySIS 3.0; Soft Imaging System, Center Valley, Pensilvania, EEUU). Para analizar la integridad del músculo, los cortes transversales de músculo se tiñeron con hematoxilina/eosina (Dako, Glostrup, Denmark). Para medir el contenido de glucógeno en el músculo usamos "Periodic acid-Schiff (PAS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EEUU).

2.9. Determinación de parámetros séricos

Se obtuvo suero a partir de las muestras de sangre extraída de la vena cefálica de los perros Beagle. La sangre se recogió en tubos no heparinizados (BD Microcontainer® SST™ Tubes, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, Reino Unido) se dejaron reposar 20-30 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 12000 g a 4°C para obtener el suero, el cual se almacenó a -80°C hasta el momento de la determinación de los diferentes parámetros. Las muestras de suero para medir péptido C se protegieron de la destrucción proteolítica añadiéndole Aprotinina (Sigma, St.Louis, Missouri, EEUU). En el caso de las muestras procesadas por el *Servei de Bioquímica Clínica Veterinaria (SBCV)* de la *Facultat de Veterinària* de la UAB, las muestras una vez extraídas se conservaron a 4 °C y llevadas

a dicho servicio donde las centrifugaron y midieron los diferentes parámetros el mismo día.

2.9.1. Insulina y péptido C

La insulina humana y el péptido C humano fueron medidos en muestras de suero mediante radioinmunoensayo (RIA) (Callejas et al., 2013). Un RIA es una técnica de ensayo *in vitro* muy sensible usada para medir concentraciones de antígenos mediante el uso de anticuerpos, con una sensibilidad en ambos ensayos de 0.1 ng/mL. La insulina sérica se midió mediante un RIA de insulina Humana (Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU) y el péptido C humano con un RIA de péptido C (Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU), siguiendo las instrucciones del kit. Se utilizó un contador de radiaciones gamma para contar la radioactividad.

2.9.2. Determinación de la glucosa en sangre

Los niveles de glucosa sérica se determinaron a partir de una gota de sangre procedente de la vena cefálica o safena de los perros y de una gota de sangre procedente de la cola de los ratones, mediante el sistema Glucometer Elite™ (Bayer, Leverkusen, Alemania).

2.9.3. Determinación de fructosamina, triglicéridos y colesterol

Los niveles en suero de fructosamina, de triglicéridos y de colesterol se midieron mediante espectrofotometría en el *Servei de Bioquímica Clínica Veterinaria* (SBCV) de la *Facultat de Veterinària* de la UAB.

2.10. Determinación de actividad glucoquinasa

La actividad glucoquinasa se midió a partir de extractos de muestras de los músculos *quadriceps femoris* y *tibialis cranialis* congelados. Se homogenizaron las muestras con un tampón en hielo y a un pH de 7.4, que contenía 100 mmol/L de Gly-Gly, 200 mmol/l ClK, 5 mmol/l DTT y 65 mmol/L Tris. Para separar el sobrenadante del *pellet* (material insoluble) se centrifugaron las muestras, y se ensayó la capacidad de fosforilación de la glucosa en los sobrenadantes a 30°C en un tampón que contenía 50 mmol/L de Gly-Gly, 100 mmol/l KCl, 2.5 mmol/l DTT, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (1unidad/mL), 0.5 mmol/L NADP y 4.5 mmol/L ATP-Mg. La actividad glucoquinasa se calculó como la diferencia entre la capacidad

de fosforilación de la glucosa a 100 y a 0.5 mmol/L de glucosa. El contenido de proteína se midió mediante un Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Hercules, California, EEUU), este método se basa en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue cuando se une (acompleja) con proteínas. El cambio de color da lugar a un cambio en la máxima absorbancia de 495 a 595 nm. Se utilizó una curva patrón con diferentes cantidades (de 0 a 20 µg) de BSA (Bovine Serum Albumin), a la que se les sometió a la misma reacción que a las muestras analizadas. Después de la adición del reactivo de Bradford, las muestras se mezclaron y se incubaron durante 5 minutos. La medida final de absorbancia se realizó a 595nm en un espectrofotómetro Power wave HT microplate (Bio Tek Instruments Inc., VT, EEUU). La actividad glucoquinasa se expresó en mU/mg de proteína.

2.11. Test de tolerancia a la glucosa

2.11.1. Test de tolerancia a la glucosa en ratones

Se realizó el test de tolerancia a la glucosa para comprobar si los ratones eran capaces de responder correctamente a una sobrecarga de glucosa. Los animales se ayunaron 16 horas antes del test. Pasadas las horas de ayuno se determinó la glucemia basal a partir de una gota de sangre de la vena de la cola mediante el sistema Glucometer Elite®. Posteriormente, se les inyectó intraperitonealmente una dosis de 1 o 2 g de glucosa /Kg de peso. A partir de este momento, se realizaron extracciones de gotas de sangre seriadas a los 15 y 30 minutos después de la inyección de glucosa y, posteriormente, cada 30 minutos hasta las 2.5 horas del inicio del test para determinar la evolución de la glucemia a lo largo del tiempo. Durante este proceso los animales no tuvieron acceso a la comida ni al agua. Los resultados de las glucemias se expresaron en mg/dL en los diferentes puntos del experimento.

2.11.2. Test de tolerancia a la glucosa en perros

Los test de tolerancia a la glucosa se realizaron con los perros ayunados 12 horas y recibieron una dosis de 1.75 g/kg de peso corporal de glucosa en forma de bolo oral a partir de un suero glucosado al 50 % (B. Braun, Barcelona, España). Se determinó la glucemia mediante extracción de sangre en la vena cefálica o safena en el tiempo 0, 15, 30 minutos y después cada media hora hasta 3 horas después de la administración de glucosa. La medida de glucemia se determinó con el sistema Glucometer Elite®.

2.12. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (E.E.M). Las diferencias significativas se han determinado utilizando el t-student para los datos no pareados considerando * $p \leq 0.05$ significativos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Rasoul, M., Habib, H., and Al-Khouly, M. (2006). "The honeymoon phase" in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors. *Pediatr. Diabetes* 7, 101–107.
- Alam, T., Wai, P., Held, D., Vakili, S.T.T., Forsberg, E., and Sollinger, H. (2013). Correction of Diabetic Hyperglycemia and Amelioration of Metabolic Anomalies by Minicircle DNA Mediated Glucose-Dependent Hepatic Insulin Production. *PLoS One* 8.
- Alberti, K.G.M.M., and Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* 15, 539–553.
- American Diabetes Association (ADA, 2017). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 40 (Suppl 1). ISSN 0149-5992.
- Ayuso, E., Mingozi, F., and Bosch, F. (2010a). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr. Gene Ther.* 10, 423–436.
- Ayuso, E., Mingozi, 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.
- Balakrishnan, B., and Jayandharan, G.R. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 14, 86–100.
- Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., and Fletcher, A.A. (1922). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Indian J. Med. Res.* 125.
- Basta, G., Schmidt, A.M., and De Caterina, R. (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* 63, 582–592.
- Beam, S., Correa, M.T., and Davidson, M.G. (1999). A retrospective-cohort study on the development of cataracts in dogs with diabetes mellitus: 200 cases. *Vet. Ophthalmol.* 2, 169–172.
- Bell, G.I., Pilkis, S.J., Weber, I.T., and Polonsky, K.S. (1996). Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 171–186.
- Bergental, R. M. (2004). Effective insulin therapy. In "International Textbook of Diabetes" (R. A. F. DEFronzo, E.; Keen, H and Zimmet, P., Ed.). John Wiley & Sons.
- Van Belle, T., Coppieters, K., and Von Herrath, M. (2011). Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiol Rev* 91, 79–118.
- Bennett, J., Wellman, J., Marshall, K.A., McCague, S., Ashtari, M., DiStefano-Pappas, J., Elci, O.U., Chung, D.C., Sun, J., Wright, J.F., et al. (2016). Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *Lancet (London, England)* 388, 661–672.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Bluestone, J.A., Herold, K., and Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical

interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464, 1293–1300.

Bousette, N., Patel, L., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., and Giaid, A. (2004). Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 176, 117–123.

Bruttomesso, D., Costa, S., and Baritussio, A. (2009). Continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) 30 years later: still the best option for insulin therapy. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 25, 99–111.

Buller, R.M., Janik, J.E., Sebring, E.D., and Rose, J.A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* 40, 241–247.

Burkhardt, B.R., Parker, M.J., Zhang, Y.C., Song, S., Wasserfall, C.H., and Atkinson, M.A. (2005). Glucose transporter-2 (GLUT2) promoter mediated transgenic insulin production reduces hyperglycemia in diabetic mice. *FEBS Lett.* 579, 5759–5764.

Butler, A.E., Janson, J., Soeller, W.C., and Butler, P.C. (2003). Increased Beta -Cell Apoptosis Prevents Adaptive Increase in Beta -Cell Mass in Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 52, 2304–2314.

Callejas, D., Mann, C.J., Ayuso, E., Lage, R., Grifoll, I., Roca, C., Andaluz, A., Ruiz-de Gopegui, R., Montané, J., Muñoz, S., et al. (2013). Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes* 62, 1718–1729.

Casto, B.C., Atchison, R.W., and Hammon, W.M. (1967). Studies on the relationship between adeno-associated virus type I (AAV-1) and adenoviruses. I. Replication of AAV-1 in certain cell cultures and its effect on helper adenovirus. *Virology* 32, 52–59.

Chen, R., Meseck, M.L., and Woo, S.L. (2001). Auto-regulated hepatic insulin gene expression in type 1 diabetic rats. *Mol. Ther.* 3, 584–590.

Chhabra, P., and Brayman, K.L. (2013). Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 328–336.

Cinar, A. (2017). Multivariable Adaptive Artificial Pancreas System in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 17, 88.

Concannon, P., Rich, S.S., and Nepom, G.T. (2009). Genetics of Type 1A Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 360, 1646–1654.

Cooper, J.D., Howson, J.M.M., Smyth, D., Walker, N.M., Stevens, H., Yang, J.H.M., She, J.X., Eisenbarth, G.S., Rewers, M., Todd, J.A., et al. (2012). Confirmation of novel type 1 diabetes risk loci in families. *Diabetologia* 55, 996–1000.

Croze, F., and Prud'homme, G.J. (2003). Gene therapy of streptozotocin-induced diabetes by intramuscular delivery of modified preproinsulin genes. *J. Gene Med.* 5, 425–437.

Curtis, T.M., Gardiner, T.A., and Stitt, A.W. (2009). Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? *Eye (Lond).* 23, 1496–1508.

Dale, A.C., Vatten, L.J., Nilsen, T.I., Midthjell, K., and Wiseth, R. (2008). Secular decline in mortality from coronary heart disease in adults with diabetes mellitus: cohort study. *BMJ* 337, a236–a236.

Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)* 367, 847–858.

- Davison, L.J., Herrtage, M.E., and Catchpole, B. (2005). Study of 253 dogs in the United Kingdom with diabetes mellitus. *Vet. Rec.* *156*, 467–471.
- DCCT (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **329**: 977-86.
- DeFronzo, R.A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., Felber, J.P., and DeFronzo, R.A. (1981). The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose Results from Indirect Calorimetry and Hepatic and Femoral Venous Catheterization.
- Devendra, D., Liu, E., Eisenbarth, G.S., and Davis, B. (2004). Clinical review Type 1 diabetes : recent developments. *Br. Med. J.* *328*, 750–754.
- Deyle, D.R., and Russell, D.W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *11*, 442–447.
- Dong, H., and Woo, S.L. (2001). Hepatic insulin production for type 1 diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* *12*, 441–446.
- Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T., and Samulski, R.J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* *70*, 3227–3234.
- Ferre, T., Pujol, A., Riu, E., Bosch, F., and Valera, A. (1996). Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 7225–7230.
- Ferre, T., Riu, E., Franckhauser, S., Agudo, J., and Bosch, F. (2003). Long-term overexpression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance. *Diabetologia* *46*, 1662–1668.
- Feuer, W.J., Schiffman, J.C., Davis, J.L., Porciatti, V., Gonzalez, P., Koilkonda, R.D., Yuan, H., Lalwani, A., Lam, B.L., and Guy, J. (2016). Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Ophthalmology* *123*, 558–570.
- Flotte, T.R., Trapnell, B.C., Humphries, M., Carey, B., Calcedo, R., Rouhani, F., Campbell-Thompson, M., Yachnis, A.T., Sandhaus, R.A., McElvaney, N.G., et al. (2011). Phase 2 Clinical Trial of a Recombinant Adeno-Associated Viral Vector Expressing α_1 -Antitrypsin: Interim Results. *Hum. Gene Ther.* *22*, 1239–1247.
- Fong, D.S., Aiello, L.P., Ferris, F.L., and Klein, R. (2004). Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* *27*, 2540–2553.
- Fracassi, F., Boretti, F.S., Sieber-Ruckstuhl, N.S., and Reusch, C.E. (2012). Use of insulin glargine in dogs with diabetes mellitus. *Vet. Rec.* *170*, 52–52.
- Furtado, L.M., Somwar, R., Sweeney, G., Niu, W., and Klip, A. (2002). Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem. Cell Biol.* *80*, 569–578.
- Gaudet, D., Méthot, J., and Kastelein, J. (2012). Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Curr. Opin. Lipidol.* *23*, 310–320.
- Gazda, L.S., Vinerean, H. V., Laramore, M.A., Hall, R.D., Carraway, J.W., and Smith, B.H. (2014). No evidence of viral transmission following long-term implantation of agarose encapsulated porcine islets in diabetic dogs. *J. Diabetes Res.* *2014*.

- Giannini, C., and Dyck, P.J. (1993). Ultrastructural morphometric features of human sural nerve endoneurial microvessels. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 361–369.
- Giannini, C., and Dyck, P.J. (1995). Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann. Neurol.* 37, 498–504.
- Gray, S.P., and Jandeleit-Dahm, K. (2014). The pathobiology of diabetic vascular complications—cardiovascular and kidney disease. *J. Mol. Med.* 92, 441–452.
- Groskreutz, D.J., Sliwkowski, M.X., and Gorman, C.M. (1994). Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J. Biol. Chem.* 269, 6241–6245.
- Hägg-Holmberg, S., Thorn, L.M., Forsblom, C.M., Gordin, D., Elonen, N., Harjutsalo, V., Liebkind, R., Putaala, J., Tatlisumak, T., Groop, P.-H., et al. (2017). Prognosis and Its Predictors After Incident Stroke in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* dc170681.
- Hammes, H.P., Federoff, H.J., and Brownlee, M. (1995). Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol. Med.* 1, 527–534.
- Han, J., McLane, B., Kim, E.-H., Yoon, J.-W., and Jun, H.-S. (2011). Remission of Diabetes by Insulin Gene Therapy Using a Hepatocyte-specific and Glucose-responsive Synthetic Promoter. *Mol. Ther.* 19, 470–478.
- Hanaire, H., Lassmann-Vague, V., Jeandidier, N., Renard, E., Tubiana-Rufi, N., Vambergue, A., Raccach, D., Pinget, M., and Guerci, B. (2008). Treatment of diabetes mellitus using an external insulin pump: the state of the art. *Diabetes Metab.* 34, 401–423.
- Hassan, G.S., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., and Giaid, A. (2005). Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis. *Peptides* 26, 2464–2472.
- Hattersley, A., Bruining, J., Shield, J., Njolstad, P., and Donaghue, K. (2006). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006–2007. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children. *Pediatr. Diabetes* 7, 352–360.
- Hermann, R., Bartsocas, C.S., Soltész, G., Vazeou, a, Paschou, P., Bozas, E., Malamitsi-Puchner, a, Simell, O., Knip, M., and Ilonen, J. (2004). Genetic screening for individuals at high risk for type 1 diabetes in the general population using HLA Class II alleles as disease markers. A comparison between three European populations with variable rates of disease incidence. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 20, 322–329.
- High, K.H., Nathwani, A., Spencer, T., and Lillicrap, D. (2014). Current status of haemophilia gene therapy. *Haemophilia* 20, 43–49.
- Hirata, R.K., and Russell, D.W. (2000). Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J. Virol.* 74, 4612–4620.
- Holt, R.I.G. (2017). *Textbook of Diabetes*. Fifth edition. (R.I.G. Holt, C.Cockram, A. Flyvbjerg, B.J. Goldstein, eds.). Wiley Blackwell, Oxford, UK.
- Ilonen, J., Hammais, A., Laine, A.P., Lempainen, J., Vaarala, O., Veijola, R., Simell, O., and Knip, M. (2013). Patterns of β -cell autoantibody appearance and genetic associations during the first years of life. *Diabetes* 62, 3636–3640.

- International Diabetes Federation (IDF, 2015). Diabetes atlas. Seventh ed.
- lynedjian, P.B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem. J.* 293, 1–13.
- 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.
- Kaneko, J. J. (2008). Carbohydrate metabolism and its diseases. Sixth edition ed. *In "Clinical Biochemistry of Domestic Animals"* (J. J. Kaneko, J. W. Harvey, and M. L. Bruss, Eds.), pp. 45-80. Elsevier Academic Press, London, UK.
- Kannel, W.B., Hjortland, M., and Castelli, W.P. (1974). Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. *Am. J. Cardiol.* 34, 29–34.
- Kay, M.A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* 12, 316–328.
- 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.
- Kerr, H.R., Hatipoglu, B., and Krishnamurthi, V. (2015). Pancreas transplant for diabetes mellitus. *Cleve. Clin. J. Med.* 82, 738–744.
- Knip, M., Veijola, R., Virtanen, S.M., Hyo, H., Vaarala, O., and Åkerblom, H.K. Diabetes.
- Kotterman, M.A., and Schaffer, D. V (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15, 445–451.
- Kozłowski, M., Olson, D.E., Rubin, J., Lyszkowicz, D., Campbell, A., and Thulé, P.M. (2007). Adeno-associated viral delivery of a metabolically regulated insulin transgene to hepatocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 273, 6–15.
- Krischer, J.P., Lynch, K.F., Schatz, D.A., Ilonen, J., Lernmark, Å., Hagopian, W.A., Rewers, M.J., She, J.-X., Simell, O.G., Toppari, J., et al. (2015). The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia* 58, 980–987.
- Krolewski, A.S., Niewczas, M.A., Skupien, J., Gohda, T., Smiles, A., Eckfeldt, J.H., Doria, A., and Warram, J.H. (2014). Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. *Diabetes Care* 37, 226–234.
- Lamos, E.M., Younk, L.M., and Davis, S.N. (2016). Concentrated insulins: The new basal insulins. *Ther. Clin. Risk Manag.* 12, 389–400.
- Lamothe, B., Baudry, a, Desbois, P., Lamotte, L., Bucchini, D., De Meyts, P., and Joshi, R.L. (1998). Genetic engineering in mice: impact on insulin signalling and action. *Biochem. J.* 335 (Pt 2, 193–204.
- Landstedt-Hallin, L. (2015). Changes in HbA_{1c}, insulin dose and incidence of hypoglycemia in patients with type 1 diabetes after switching to insulin degludec in an outpatient setting: An observational study. *Curr. Med. Res. Opin.* 31, 1487–1493.

- Libby, P. (2001). Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104, 365–372.
- Lisowski, L., Tay, S.S., and Alexander, I.E. (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 24, 59–67.
- Lynch, K.F., Lernmark, B., Merlo, J., Cilio, C.M., Ivarsson, S., and Lernmark, a (2008). Cord blood islet autoantibodies and seasonal association with the type 1 diabetes high-risk genotype. *J. Perinatol.* 28, 211–217.
- Mann, C.J., Ayuso, E., Anguela, X.M., and Bosch, F. (2010). Skeletal muscle metabolism in the pathology and treatment of type 1 diabetes. *Curr. Pharm. Des.* 16, 1002–1020.
- Manno, C.S., Chew, A.J., Hutchison, S., Larson, P.J., Herzog, R.W., Arruda, V.R., Tai, S.J., Ragni, M. V, Thompson, A., Ozelo, M., et al. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Analgesia* 101, 2963–2972.
- 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.
- Martino, A.T., Herzog, R.W., Anegon, I., and Adjali, O. (2011). Measuring immune responses to recombinant AAV gene transfer. *Methods Mol. Biol.* 807, 259–272.
- Martino, L., Masini, M., Bugliani, M., Marselli, L., Suleiman, M., Boggi, U., Nogueira, T.C., Filippini, F., Occhipinti, M., Campani, D., et al. (2015). Mast cells infiltrate pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 58, 2554–2562.
- Mas, A., Montané, J., Anguela, X.M., Muñoz, S., Douar, A.M., Riu, E., Otaegui, P., and Bosch, F. (2006). Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* 55, 1546–1553.
- Mathews, C.K., van Holde, K.E., Appling, D.R., and Anthony-Cahill, S.J. (2012). “Biochemistry”. 4th Edition ed. Prentice Hall.
- Matschinsky, F.M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45, 223–241.
- Matschinsky, F.M., Magnuson, M.A., Zelent, D., Jetton, T.L., Doliba, N., Han, Y., Taub, R., and Grimsby, J. (2006). The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55, 1–12.
- McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 8, 1248–1254.
- McCarty, D.M., Young, S.M., and Samulski, R.J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38, 819–845.
- McIntosh, J.H., Cochrane, M., Cobbold, S., Waldmann, H., Nathwani, S.A., Davidoff, A.M., and Nathwani, A.C. (2012). Successful attenuation of humoral immunity to viral capsid and transgenic protein following AAV-mediated gene transfer with a non-depleting CD4 antibody and cyclosporine. *Gene Ther.* 19, 78–85.
- Mendell, J.R., Rodino-Klapac, L.R., Rosales-Quintero, X., Kota, J., Coley, B.D., Galloway, G.,

- Craenen, J.M., Lewis, S., Malik, V., Shilling, C., et al. (2009). Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores α -sarcoglycan and associated proteins. *Ann. Neurol.* *66*, 290–297.
- Miao, D., Yu, L., and Eisenbarth, G.S. (2007). Role of autoantibodies in type 1 diabetes. *Front. Biosci.* *12*, 1889–1898.
- 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.
- Mizutani, M., Kern, T.S., and Lorenzi, M. (1996). Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J. Clin. Invest.* *97*, 2883–2890.
- Molitch, M.E., Steffes, M., Sun, W., Rutledge, B., Cleary, P., de Boer, I.H., Zinman, B., Lachin, J., and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study Group (2010). Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care* *33*, 1536–1543.
- Morral, N., McEvoy, R., Dong, H., Meseck, M., Altomonte, J., Thung, S., and Woo, S.L.C. (2002). Adenovirus-mediated expression of glucokinase in the liver as an adjuvant treatment for type 1 diabetes. *Hum. Gene Ther.* *13*, 1561–1570.
- 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.
- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* *219*, 713–725.
- Nathan, D., and et al. (2005). Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2643–2653.
- Nathan, D.M., Zinman, B., Cleary, P.A., Backlund, J.-Y.C., Genuth, S., Miller, R., and Orchard, T.J. (2009). Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2. *Arch. Intern. Med.* *169*, 1307–1316.
- Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N.E., and Popa-wagner, R. (2012). Properties of the Adeno-Associated Virus Assembly-Activating Protein. *86*, 13038–13048.
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., and Ali, P.A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.* *1*, 27.
- Nelson, R. W. (2010). Canine Diabetes Mellitus. Seventh Edition ed. *In* "Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat" (S. J. Ettinger, and E. C. Feldman, Eds.), pp. 1449-1474. 2 vols. Saunders Elsevier, Sant Louis, USA
- Ngoi, S.M., Chien, A.C., and Lee, C.G.L. (2004). Exploiting internal ribosome entry sites in gene therapy vector design. *Curr. Gene Ther.* *4*, 15–31.

- Obrosova, I.G., Chung, S.S.M., and Kador, P.F. (2010). Diabetic cataracts: mechanisms and management. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* *26*, 172–180.
- Otaegui, P.J., Ferre, T., Pujol, A., Riu, E., Jimenez, R., and Bosch, F. (2000). Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia. *Hum. Gene Ther.* *11*, 1543–1552.
- Otaegui, P.J., Ontiveros, M., Ferre, T., Riu, E., Jiménez, R., and Bosch, F. (2002). Glucose-regulated glucose uptake by transplanted muscle cells expressing glucokinase counteracts diabetic hyperglycemia. *Hum. Gene Ther.* *13*, 2125–2133.
- Papadakis, E.D., Nicklin, S.A., Baker, A.H., and White, S.J. (2004). Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* *4*, 89–113.
- Patel, T.P., Rawal, K., Bagchi, A.K., Akolkar, G., Bernardes, N., Dias, D. da S., Gupta, S., and Singal, P.K. (2016). Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Fail. Rev.* *21*, 11–23.
- Pickup, J.C., and Sutton, A.J. (2008). Severe hypoglycaemia and glycaemic control in Type 1 diabetes: meta-analysis of multiple daily insulin injections compared with continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabet. Med.* *25*, 765–774.
- Pierce, E.A., and Bennett, J. (2015). The Status of *RPE65* Gene Therapy Trials: Safety and Efficacy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *5*, a017285.
- Powell, S.K., Rivera-Soto, R., and Gray, S.J. (2015). Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov. Med.* *19*, 49–57.
- Printz, R.L., Magnuson, M.A., and Granner, D.K. (1993). Mammalian glucokinase. *Annu. Rev. Nutr.* *13*, 463–496.
- Rakyan, V.K., Beyan, H., Down, T.A., Hawa, M.I., Maslau, S., Aden, D., Daunay, A., Busato, F., Mein, C.A., Manfras, B., et al. (2011). Identification of type 1 Diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis. *PLoS Genet.* *7*, 1–9.
- Rao, M. V., Donoghue, M.J., Merlie, J.P., and Sanes, J.R. (1996). Distinct regulatory elements control muscle-specific, fiber-type-selective, and axially graded expression of a myosin light-chain gene in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 3909–3922.
- Rea, S., and James, D.E. (1997). Moving GLUT4: The biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* *46*, 1667–1677.
- Resnick, H., Vinik, A., Schwartz, A., Leveille, S., Brancati, F., Balfour, J., and Guralnik, J. (2000). Independent effects of peripheral nerve dysfunction on lower-extremity physical function in old age: The Women's Health and Aging Study. *Diabetes Care* *23*, 1642–1647.
- Riu, E., Mas, A., Ferre, T., Pujol, A., Gros, L., Otaegui, P., and Montoliu, L. (2002). Counteraction of Type 1 Diabetic Alterations by Insights From Transgenic Mice. *Diabetes* *51*, 704–711.
- Rodacki, M., Milech, A., and de Oliveira, J.E.P. (2006). NK cells and type 1 diabetes. *Clin. Dev. Immunol.* *13*, 101–107.
- Rowe, R.E., and Leslie, R.D. (1995). Twin studies in insulin dependent diabetes and other autoimmune diseases. *Diabetes. Metab. Rev.* *11*, 121–135.

- Rowe, P.A., Campbell-Thompson, M.L., Schatz, D.A., and Atkinson, M.A. (2011). The pancreas in human type 1 diabetes. *Semin. Immunopathol.* *33*, 29–43.
- 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.
- 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.
- Selden, R.F., Skoskiewicz, M.J., Burke-Howie, K., Russell, P.S., and Goodman, H.M. (1987). Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy. *Science* (80-). *236*, 714–718.
- Shalaby, D., Saied, M., Khater, D., and Zeid, A.A. (2017). The Expression of Activating Receptor Gene of Natural Killer Cells (KLRC3) in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM). *Oman Med. J.* *32*, 316–321.
- Shapiro, A.M.J., Ricordi, C., Hering, B.J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R.P., Secchi, A., Brendel, M.D., Berney, T., Brennan, D.C., et al. (2006). International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. *N. Engl. J. Med.* *355*, 1318–1330.
- Shaw, J.A.M., Delday, M.I., Hart, A.W., Docherty, H.M., Maltin, C.A., and Docherty, K. (2002). Secretion of bioactive human insulin following plasmid-mediated gene transfer to non-neuroendocrine cell lines, primary cultures and rat skeletal muscle in vivo. *J. Endocrinol.* *172*, 653–672.
- Shin, J.S., Kim, J.M., Kim, J.S., Min, B.H., Kim, Y.H., Kim, H.J., Jang, J.Y., Yoon, I.H., Kang, H.J., Kim, J., et al. (2015). Long-term control of diabetes in immunosuppressed nonhuman primates (NHP) by the transplantation of adult porcine islets. *Am. J. Transplant.* *15*, 2837–2850.
- Simonson, G.D., Debrya, J., Gorman, C.M., and Al, S.E.T. (1996). Synthesis and Processing of Genetically Modified Proinsulin by Rat Myoblast Primary Human Cultures. Downloaded by UAB / FAC. CIENCIAS from online. liebertpub.com at 09 / 06 / 17. For personal use only. *78*, 71–78.
- Skyler, J.S. (1996). Diabetic complications. The importance of glucose control. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *25*, 243–254.
- Snyder, R.O., Audit, M., and Francis, J.D. (2011). rAAV vector product characterization and stability studies. *Methods Mol. Biol.* *807*, 405–428.
- Spencer, H.T., Riley, B.E., and Doering, C.B. (2016). State of the art: gene therapy of haemophilia. *Haemophilia* *22*, 66–71.
- 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.
- Stene, L.C. (2016). Gaps in life expectancy for people with type 1 diabetes. *Diabetologia* *59*, 1150–1152.
- Szymczak-Workman, A.L., Vignali, K.M., and Vignali, D.A.A. (2012). Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2012*, 199–204.

- Thakkar, U.G., Vanikar, A. V., and Trivedi, H.L. (2017). Stem cells: An emerging novel therapeutic for type-1 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 130, 130–132.
- Thanabalasingham, G., and Owen, K.R. (2011). Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). *BMJ* 343, d6044.
- Thomson, G., Valdes, A.M., Noble, J.A., Kockum, I., Grote, M.N., Najman, J., Erlich, H.A., Cucca, F., Pugliese, A., Steenkiste, A., et al. (2007). Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: A meta-analysis. *Tissue Antigens* 70, 110–127.
- Todd, J.A. (1995). Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8560–8565.
- UKPDS (1998). Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 352, 854–865.
- Venstrom, J.M., McBride, M.A., Rother, K.I., Hirshberg, B., Orchard, T.J., and Harlan, D.M. (2003). Survival after pancreas transplantation in patients with diabetes and preserved kidney function. *JAMA* 290, 2817–2823.
- White, R.D. (2007). Insulin pump therapy (continuous subcutaneous insulin infusion). *Prim. Care* 34, 845–71, vii.
- Whites, M.F., and Kahn, C.R. (1994). The Insulin Signaling System*. *J. Biol. Chem.* 269, 1–4.
- Williams, D.L., Heath, M.F., and Wallis, C. (2004). Prevalence of canine cataract: Preliminary results of a cross-sectional study. *Vet. Ophthalmol.* 7, 29–35.
- World Health Organization (WHO) (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Geneva, Switzerland.
- Wright, E.M., Turk, E., Zabel, B., Mundlos, S., and Dyer, J. (1991). Molecular genetics of intestinal glucose transport. *J. Clin. Invest.* 88, 1435–1440.
- Yang, Y.-W., and Chao, C.-K. (2003). Incorporation of calcium phosphate enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene therapy in diabetic mice. *J. Gene Med.* 5, 417–424.
- Yin, D., and Tang, J.G. (2001). Gene therapy for streptozotocin-induced diabetic mice by electroporational transfer of naked human insulin precursor DNA into skeletal muscle in vivo. *FEBS Lett.* 495, 16–20.
- Yue, Y., and Dongsheng, D. (2002). Development of multiple cloning site cis-vectors for recombinant adeno-associated virus production. *Biotechniques* 33, 672, 674, 676–678.
- Zanda, M., Onengut-Gumuscu, S., Walker, N., Shtir, C., Gallo, D., Wallace, C., Smyth, D., Todd, J.A., Hurles, M.E., Plagnol, V., et al. (2014). A Genome-Wide Assessment of the Role of Untagged Copy Number Variants in Type 1 Diabetes. *PLoS Genet.* 10.
- Zhang, T., and Dong, H.H. (2015). Glucose-regulated insulin production in the liver improves glycemic control in type 1 diabetic mice. *Mol. Metab.* 4, 70–76.
- Ziegler, D., Papanas, N., Vinik, A.I., and Shaw, J.E. (2014). Epidemiology of polyneuropathy in diabetes and prediabetes. pp. 3–22.

Zolotukhin, S., Byrne, B., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R., and Muzyczka, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* 6, 973–985.

Consensus statement: Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. American Diabetes Association American Academy of Neurology. *Diabetes Care* 11, 592–597.