



Universitat Autònoma de Barcelona

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL
I TERÀPIA GÈNICA (CBATEG)**

**TERÀPIA GÈNICA PER NEUROPATIA DIABÈTICA
MITJANÇANT VECTORS ADENO-ASSOCIATS
CODIFICANT PEL FACTOR DE CREIXEMENT
SIMILAR A LA INSULINA I (IGF-I)**

JUDIT HOMS I AVILA

Memòria presentada per la Llicenciada en Biologia i Bioquímica JUDIT HOMS AVILA per optar al Grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Assumpció Bosch i Merino del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Facultat de Biociències), en el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

JUDIT HOMS I AVILA

ASSUMPCIÓ BOSCH I MERINO

Maig del 2010

BELLATERRA

*Als meus pares, per estar sempre al meu costat,
per creure en mi.*

A les meves germanes, per recolzar-me en tot moment.

*A en Santi, per guiar-me, per ajudar-me i per fer-me sentir
especial en tot moment, per tot, t'estimo.*

AGRAÏMENTS

Per fi tanco una etapa i en començo una de nova, de moment incerta, però amb l'esperança de que sigui tan o més profitosa que aquesta que s'acaba. Per això, ha arribat el moment d'agrair a totes aquelles persones que m'han ajudat a fer possible aquesta Tesi Doctoral.

En primer lloc voldria agrair de tot cor a la Dra. Assumpció Bosch per donar-me la oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral, per exigir-me constantment i per la confiança dipositada en mi, gràcies.

Vull donar les gràcies al Dr. Xavier Navarro per haver tingut suficient paciència per ensenyar-me i per escoltar-me durant tot aquest temps, i per donar-me un cop de mà sempre que ho he necessitat.

Agrair també al Dr. Miguel Chillón per aportar el seu gra de sorra en aquest treball. Per la seva gran capacitat científic-teòrica i gairebé practico-impossible, això si, sempre necessària per no estancar-se, merci Miguel.

Gràcies Mercè (Dra. Mercè Monfar) per ser com ets. Per alegrar-me les tardes eternament avorrides amb un bon trocet de xocolata negra!!. No sé que seria de la 5^a planta sense tu, sense la teva gran capacitat per organitzar i protocol·litzar les coses, moltes gràcies.

Merci Lorena, Gemma i Ester, per compartir tots aquest anys de tesi amb mi. Merci Lore per fer que totes les incomptables hores que hem passat a l'estabulari passessin més ràpid, compartint rialles, xafarderies, queixes i també cançons!!. Gemma, la teva arribada al laboratori va fer que jo ja no fos la única que parlés "raru" (gironí), merci. Ester tot i que fa dies que vas marxar del CBATEG sempre em quedarà un bonic record de les extenses i profitoses xerrades que vam tenir. Gràcies a totes. Que no m'oblidi de la gent de UPV!!, merci Susana, Maria, Cristina i Jose, per tenir sempre un moment per ajudar-me a resoldre els meus dubtes i per fer-me els virus!.

Al SER-CBATEG, per fer-se càrrec del dia a dia dels meus ratolinets durant tots aquest temps, que no són pocs. Val a dir que treballar en un estabulari SPF és tota una experiència, això de treballar enfundat en una espècie de kimono-granota semitransparent i calcetes de paper, és la part més glamurosa de tota la tesi.

Donar les gràcies especialment a la gent de la 4^a planta, a la gent del Dr. Jesús Ruberte, per acollir-me com una més en el grup, per fer-me sentir tan a gust amb tots vosaltres i sobretot per donar-me un cop de mà sempre que ho he necessitat, per escoltar-me, recolzar-me i fer-me riure!! Gràcies Vero, Lorena, Mariana i en especial a l'Àngel i en David per despedir-me d'una manera tan especial. La veritat és que cada cop que tanco els ulls em ve la imatge....no ho oblidaré mai, ja ho diuen que una imatge val més que mil paraules!! Moltes gràcies a tots.

A la gent del cotxe, a en Xavi, la Sara, en Teo, l'Ana, en Christian, la Mar, la Montse, en Francesc i l'Ernesto, per fer que els viatges en cotxe fossin més curts i entretinguts, gràcies.

Nenes, per fi, un tema menys del que explicar-nos en els sopars de "marujas" oe! No us preocupeu, que som totes dones de recursos i segur que tenim corda per estona. Merci Cristina, Arantxa, Ainara, Clara, Dolors i Laura, per preocupar-vos per mi. A la Maica per tots aquest anys de carrera i tesi que hem compartit, per tots els bons moments viscuts i per la paciència d'escoltar tots els meus mals de cap. A la Noèlia, per tot aquells intercanvis de receptes culinàries i per les eternes converses on ho posàvem tot al seu lloc. Bertaaa, de Girona a Barcelona i de Barcelona a qualsevol part del món, gràcies per obligar-me a venir a la city i fer-me sortir de la rutina tot prenent un té, cafè o sushi!!

A les meves germanes Sara i Jorgina per fardar constantment de germana, no sé com ho feu per portar això de tenir una germana tan...cc com jo. Gràcies Sara, per fer-me costat. Jorgina, gràcies per el teu suport tècnic, per ajudar-me a fer la portada, saps que la paciència i jo encara no som del tot compatibles. Gràcies sobretot als meus pares (Emili i Montserrat), per creure en mi, per animar-me i encoratjar-me en tot moment. Santi, no tinc paraules per agrair-te la teva paciència, gràcies per guiar-me, ajudar-me i animar-me constantment, per tot això i molt més, t'estimo.

Aquest treball ha estat possible gràcies a la beca predoctoral de l'Association Francaise contre les Myopathies (AFM), de la que he estat beneficiària durant dos anys (AFM2007/12763AE; AFM2008/13622AE). Les investigacions s'han realitzat també gràcies al finançament rebut del Instituto de Salud Carlos III (PI051705 i PS090720), de l'AGAUR (SGR 2009-1300), del BrainCAV (Unión Europea. HEALTH-2007-1.4-5. Proposal No.: 222992) i de la Universitat Autònoma de Barcelona, UAB (EME2004-07).

ABREVIACIONES

AAV	Virus Adeno-Associat
AAVsc	Virus Adeno-Associat de cadena complementària
Ab	Anticòs
Ad	Adenovirus
AGE	Productes de glicació (<i>Advanced glycation end-products</i>)
Akt(PKB)	Proteïna quinasa B
Akt-P	Proteïna quinasa B fosforilada
BDNF	Factor neurotròfic derivat de cervell (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
BH	Barrera hematoencefàlica
BSA	Albúmina sèrica bovina
CAG	Promotor de la β -Actina de pollastre amb l'enhancer de CMV
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
CMAP	Potencial d'acció compost de múscul
CMV	Promotor gran de citomegalovirus (<i>Citomegalovirus Major Promoter</i>)
CNAP	Potencial d'acció compost a nervi
CNTF	Factor neurotròfic ciliar (<i>Ciliary neurotrophic factor</i>)
Ct	Cicle llindar (<i>Thershold cycle</i>)
DM	Diabetis Mellitus
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNAsa	Desoxiribonucleasa
dNTP	Deoxinucleòtid trifosfat
DRG	Gangli de l'arrel dorsal (<i>Dorsal root ganglia</i>)
ECL	(<i>enhanced chemiluminiscence</i>)
ELISA	(<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FBS	Sèrum fetal boví
G	gravetat (unitat de força centrífuga)
GDNF	Factor neurotròfic derivat de la glia (<i>Glial-derived neurotrophic factor</i>)
GFAP	Proteïna glial àcida fibrillar (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	Proteïna verda fluorescent
HSV	Virus herpes simple
ICR	Regió control d'imprinting (<i>Imprinting control region</i>)
IGF-I	Factor de creixement similar a la insulina I
IGF-II	Factor de creixement similar a la insulina II
IGF-IR	Receptor del factor de creixement similar a la insulina I
IGF-IIR	Receptor del factor de creixement similar a la insulina I
IGFBP	Proteïna d'unió a factors de creixement similar a la insulina
ITR	Repeticions terminals invertides (<i>Inverted Terminal Repeat</i>)
IU	Unitats d'infecció
l	litres
LCR	Líquid cefaloraquidi
LMN	Neurona motora (<i>Lower motor neuron</i>)
MAG	Glicoproteïna associada a la mielina
MCS	Lloc de clonació múltiple
µg	Micrograms
µl	Microlitre
µM	Micromolar
ml	Mil·lilitre
mM	Milimolar
MOI	Multiplicitat d'infecció
Min	Minuts

MBP	Proteïna d'unió a la mielina
MF	Fibra mielinitzada
MNCV	Velocitat de conducció nerviosa motora
Mr	Massa relativa
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
ms	Milisegons
NaCl	Clorur de sodi
ND	Neuropatia diabètica
NDP	Neuropatia diabètica perifèrica
Ng	Nanograms
NGF	Factor de creixement nerviós
NOD	Ratolí no obès diabètic
NT-3	Neurotrofina 3
ob/ob	ratolí obès deficient en leptina
pb	Parells de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEG	Poliètilenglicol
PEI	Poliètilenimina
PFA	Paraformaldehid
PKC	Proteïna quinasa C
pm	Picomol
PMP22	Proteïna 22 de la mielina perifèrica
polyA	Seqüència de poliadenilació
p/v	pes/volum
P0	Proteïna zero de la mielina
q-PCR	PCR quantitativa o PCR a temps real
RAGE	Receptor de productes de glicació (<i>Advanced glycation end-products receptor</i>)
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	revolucions per minut
RT	Temperatura ambient
SC	Cèl·lula de Schwann
SCi	Cèl·lula de Schwann immadura
SCp	Precursor de cèl·lula de Schwann
S-L	Incisures de Smith-Lanterman
SNC	Sistema nerviós central
SNCVd	Velocitat de conducció nerviosa sensorial distal
SNCVp	Velocitat de conducció nerviosa sensorial proximal
SNP	Sistema nerviós perifèric
SNPA	Sistema nerviós perifèric autònom
SNPAs	Sistema nerviós perifèric autònom simpàtic
SNPAp	Sistema nerviós perifèric autònom parasimpàtic
STZ	Estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea) 1-D β glucopiranososa)
TM	Temperatura de melting
VEGF	Factor de creixement de l'endoteli vascular
Vg	genomes virals
WB	Western-blot
WPRE	enhancer post-transcripcional del virus de l'hepatitis de marmota (<i>Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional enhancer</i>)
°C	graus centígrads

INDEX

I. RESUM	1
II. INTRODUCCIÓ	5
1. SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC	5
1.1. Anatomia del sistema nerviós perifèric	5
1.2. Classificació i funció del sistema nerviós perifèric	7
1.2.1. Sistema nerviós perifèric motor	7
1.2.2. Sistema nerviós perifèric sensorial	9
1.3. Glia del sistema nerviós perifèric	12
1.3.1. Fibres nervioses amielíniques	12
1.3.2. Fibres nervioses mielíniques	13
1.4. La mielina	13
1.4.1. Estructura de la mielina	13
1.4.2. Proteïnes de la mielina	15
2. FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC	18
2.1. Neuropatia diabètica (ND)	18
2.1.1. Diabetis Mellitus (DM)	19
2.1.2. Fisiopatologia de la neuropatia diabètica	20
2.1.3. Simptomatologia i diagnosi	21
2.1.4. Mecanismes moleculars de les complicacions de la DM	22
2.1.5. Degeneració walleriana i regeneració del nervi perifèric	27
2.1.6. Diabetis i regeneració	29
3. FACTOR DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA I (IGF-I)	31
3.1. Sistema de senyalització d'IGF-I via receptor (IGF-IR)	32
3.2. IGF-I a sistema nerviós	34
4. TERÀPIA GÈNICA	37
4.1. Teràpia gènica viral	37
4.2. Actualitat de la teràpia gènica	39
4.3. Vectors Adeno-associats	39
4.3.1. Vectors Adeno-associats de cadena complementària	41
4.3.2. Serotips de virus Adeno-associats	42
4.3.2.1. <i>Clades</i>	43
4.3.3. Tropisme dels virus Adeno-associats	45
4.4. Teràpia gènica per neuropatia	48
III. OBJECTIUS	55
IV. RESULTATS	59
PART I: TROPISME DE DIFERENTS VECTORS ADENO-ASSOCIATS A SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC	59
1. Construcció de genomes de vectors Adeno-associats	59

2. Estudi del tropisme <i>in vitro</i> dels serotips de virus Adeno-associats	59
3. Estudi del tropisme d'AAVs <i>in vivo</i> a sistema nerviós perifèric	61
3.1. Caracterització del tropisme dels vectors AAV a SNP mitjançant injecció a nervi ciàtic	64
3.2. Caracterització del tropisme dels vectors AAV a SNP mitjançant injecció intratecal	68
3.2.1. Estudi de l'estabilitat <i>in vivo</i> dels vectors AAV1 i AAVrh10 administrats via intratecal	75
3.2.1.1. <i>Estudi de l'estabilitat del vector AAV1 a SNP</i>	75
3.2.1.2. <i>Estudi de l'estabilitat del vector AAVrh10 a SNP</i>	76
3.2.2. Estudi de la presència d'anticossos neutralitzants contra AAV1 i AAVrh10 a sèrum de ratolins injectats	77
3.2.3. Estudi comparatiu de l'eficiència de transducció i estabilitat del vector AAVrh10 ss vs AAVrh10sc	80
3.2.3.1. <i>Quantificació de la presència de genomes virals a líquid cefaloraquídi després de l'administració intratecal</i>	81
 PART II: TERÀPIA GÈNICA PER NEUROPATIA DIABÈTICA UTILITZANT AAVs QUE CODIFIQUEN PER IGF-I	 84
1. Teràpia Gènica per neuropatia diabètica mitjançant AAV1IGF-I	84
1.1. Construcció de genomes virals amb el factor de creixement IGF-I	84
1.2. Disseny experimental	85
1.3. Estudi de l'eficiència de transducció d'AAV1IGF-I a SNP en un model murí per neuropatia diabètica	86
1.3.1. Quantificació de l'expressió d'IGF-I als animals transduïts	86
1.3.2. Determinació molecular de la capacitat regenerativa d'IGF-I en neuropatia diabètica	88
1.3.3. Estudis neurofisiològics dels animals injectats amb el vector AAV1IGF-I	92
1.3.3.1. <i>Avaluació de la velocitat de conducció a nervi intacte</i>	92
1.3.3.2. <i>Avaluació de la capacitat de regeneració nerviosa a nervi lesionat</i>	93
1.3.3.3. <i>Anàlisi morfològica de nervis tibials intactes</i>	93
 2. Teràpia gènica per neuropatia diabètica mitjançant AAVrh10IGF-I	 94
2.1. Construcció de genomes virals amb el factor de creixement IGF-I	95
2.2. Disseny experimental	95
2.3. Estudi de l'eficiència de transducció d'AAVrh10IGF-Isc a SNP en un model murí per neuropatia diabètica	97
2.3.1. Quantificació de l'expressió d'IGF-I en animals transduïts	97
2.3.2. Determinació molecular de la capacitat regenerativa d'IGF-I en neuropatia diabètica	100
2.3.3. Determinació de l'efecte de AAVrh10IGF-I a neurones motores	103
2.3.4. Estudis neurofisiològics dels animals injectats amb el vector AAVrh10IGF-I	104

2.3.4.1. <i>Avaluació de la velocitat de conducció a nervi intacte</i>	104
2.3.4.2. <i>Avaluació de la capacitat de regeneració nerviosa a nervi lesionat</i>	105
2.3.4.3. <i>Anàlisi morfològica de nervis tibials intactes</i>	106
V. DISCUSSIÓ	111
VI. CONCLUSIONS	139
VII. MATERIALS I MÈTODES	143
1. MATERIALS	143
1.1. Vectors virals	143
1.2. Vectors plasmídics	143
1.3. Línies cel·lulars	143
1.4. Animals	143
2. MANIPULACIÓ DE BACTÈRIES I TÈCNIQUES RELACIONADES	145
2.1. Tècniques de manipulació de bacteries	145
2.1.1. Preparació de bacteries competents/quimiocompetents	145
2.1.2. Transformació	145
2.2. Tècniques d'obtenció i manipulació d'àcids nucleics	145
2.2.1. Minipreparacions de DNA plasmídic	145
2.2.2. Maxipreparacions de DNA plasmídic	146
2.2.3. Megapreparacions de DNA plasmídic	146
2.2.4. Quantificació del DNA	146
2.3. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa	147
2.4. Construcció de plàsmids	147
2.4.1. Enzims de restricció i desfosforilació	148
2.4.2. Lligació de fragments de DNA	148
3. CULTIUS CEL·LULARS I TÈCNIQUES RELACIONADES	149
3.1. Tècniques generals de cultiu cel·lular	149
3.1.1. Manteniment i diferenciació de cultius cel·lulars en monocapa	149
3.1.2. Criopreservació: congelació i descongelació de vials	149
3.2. Producció de vectors Adeno-associats amb iodixanol	150
3.2.1. Transfecció	150
3.2.2. Recol·lecció	151
3.2.3. Purificació per gradient de iodixanol	151
3.3. Titulació de genomes virals per picogreen	152
4. MANIPULACIÓ DELS ANIMALS I TÈCNIQUES RELACIONADES	153
4.1. Cultius organotípics	153
4.2. Injecció intracoixinets	153

4.3. Injecció intramuscular	154
4.4. Injecció intraciàtic	154
4.5. Injecció intratecal	155
4.5.1. Extracció de líquid cefaloraquídi	156
4.6. Lesió quirúrgica a nervi ciàtic (<i>crush</i>)	157
4.7. Electrofisiologies	158
4.8. Anàlisi morfomètrica de nervis tibials	159
4.8.1. Inclusió en resina spurr	159
4.8.2. Morfometries	160
4.9. Tècniques d'obtenció i manipulació de RNA i DNA de ratolí	160
4.9.1. Extracció de DNA genòmic de teixit de ratolí	160
4.9.2. Obtenció de DNA viral	161
4.9.3. Obtenció de RNA total de teixit de ratolí	161
4.9.4. Anàlisi de RNA i DNA per Real-Time PCR	162
5. TÈCNiques DE MANIPULACIÓ I OBTENCIÓ DE PROTEÏNES	165
5.1. Obtenció de proteïnes totals de teixit de ratolí	165
5.2. Quantificació de proteïnes	165
5.3. Anàlisi de proteïnes mitjançant Western-Blot	166
5.3.1. Electroforesi desnaturalitzant (SDS-PAGE)	166
5.3.2. Electrotransferència	167
5.3.3. Immunodetecció	167
5.4. Anàlisi de proteïnes mitjançant luminomèria	168
5.5. Elisa	169
5.6. Titulació d'anticossos neutralitzants en sèrum de ratolins injectats	169
5.7. Immunohistoquímica en teixit de ratolí	170
5.7.1. Preparació i obtenció de seccions de cultius organotípics de gangli de l'arrel dorsal	170
5.7.2. Preparació i obtenció de seccions de sistema nerviós perifèric	171
5.7.2.1. <i>Obtenció de seccions de criostat</i>	171
5.7.2.2. <i>immunohistoquímica en seccions de criostat</i>	172
6. ANÀLISI ESTADÍSTICA I COMPARATIVA DE LES DADES	173
VIII. BIBLIOGRAFIA	177
IX. ANNEX I	193
X. ANNEX II	219

I.RESUM

La neuropatia diabètica és una de les complicacions més freqüents de la Diabetis Mellitus. És una patologia del sistema nerviós perifèric que causa una incapacitat progressiva important de la funció motora i sensorial en els individus que la pateixen. L'afectació nerviosa es distingeix per una degeneració progressiva de les fibres nervioses i un retard en el procés de regeneració de les fibres danyades. Els símptomes de la neuropatia inclouen pèrdua de sensibilitat, rigidesa, coïssor i en ocasions dolor als peus i mans. La teràpia intensiva amb insulina redueix la incidència de les complicacions de la diabetis però els pacients diabètics continuen desenvolupant neuropatia diabètica a llarg plaç.

Els tractaments actuals per la neuropatia diabètica no són efectius i estan orientats principalment a pal·liar el dolor neuropàtic. La teràpia gènica podria ser un tractament alternatiu per aquesta patologia.

Els vectors Adeno-associats són uns dels vectors de teràpia gènica interessants per assajos clínics en humans, ja que són capaços de dirigir l'expressió del transgen a llarg plaç, mantenint-se de forma episomal a la cèl·lula hoste. A més no presenten toxicitat associada al virus silvestre, el que augmenta la bioseguretat d'aquests vectors i es poden produir a títols alts.

La recent descripció de nous serotips de vectors Adeno-associats, els quals entren a les cèl·lules humanes mitjançant diferents receptors cel·lulars, ha obert la possibilitat de delimitar selectivament la infecció de diferents tipus cel·lulars dins d'un mateix òrgan.

Amb la finalitat de caracteritzar vectors com a eines de teràpia gènica eficients per neuropatia diabètica es van utilitzar els serotips AAV1 i AAVrh10 per infectar cultius organotípics de ganglis de l'arrel dorsal (DRG) de ratolí. Ambdós vectors van mostrar un tropisme preferencial per neurones sensorials petites, correlacionant després amb el tipus de neurones transduïdes més eficientment mitjançant injecció intratecal *in vivo* en ratolins. L'estabilitat dels vectors AAV1 i AAVrh10 *in vivo* es va confirmar fins a setmana 10, duració màxima de l'experiment. No obstant l'eficiència d'AAVrh10 era molt superior a la d'AAV1 tant a neurones sensorials com motores, aconseguint un percentatge de transducció al voltant del 50% en DRG i del 30% en motoneurones amb el serotip rh10.

A més a més, s'ha demostrat que AAV1 és més immunogènic que AAVrh10 quan s'injecten a líquid cefaloraquídi, doncs l'administració d'AAV1 genera un títol molt més elevat d'anticossos neutralitzants en sang contra aquest serotip.

Com a assaig preclínic de teràpia gènica es van administrar els vectors AAV1 i AAVrh10 codificant per el factor de creixement similar a la insulina I (IGF-I) o codificant per la proteïna GFP com a control, en el líquid cefaloraquídi d'un model murí per neuropatia diabètica, que combina diabetis induïda amb estreptozotocina (STZ) junt amb lesió a nervi ciàtic (*crush*). IGF-I és un factor de creixement que juga un paper important en la supervivència i diferenciació de neurones, oligodendròcits i cèl·lules de Schwann i també en la formació de la mielina. Aquest factor de creixement ha estat utilitzat com a tractament d'una gran varietat de patologies del sistema nerviós, incloent neuropaties diverses, degut a la seva acció com a potent agent en la supervivència i diferenciació cel·lular.

L'anàlisi molecular dels nervis perifèrics dels animals tractats amb AAV-IGF-I mostrava un augment de l'expressió del gen terapèutic IGF-I, que correlacionava amb l'activació de la via de senyalització d'aquest factor de creixement, així com dels gens implicats en la regeneració (GAP43) o els gens relacionats amb la mielina (P0, PMP22, MAG, MBP), en comparació amb els animals control. A diferència d'AAV1, AAVrh10 mostrava expressió del transgen també en neurones motores de la medul·la espinal. La correlació entre les dades bioquímiques obtingudes i els tests neurofisiològics realitzats en els animals injectats amb AAV-IGF-I, va permetre observar una millora de la velocitat de conducció nerviosa sensorial en els animals tractats amb AAV1-IGF-I i una millora de la velocitat de conducció nerviosa sensorial i motora en els animals transduïts amb AAVrh10-IGF-I, respecte els animals diabètics control. Per tant, l'administració intratecal dels vectors AAV1 i principalment AAVrh10 codificant per IGF-I ofereixen una visió prometedora pel tractament o prevenció de les neuropaties perifèriques, en general, i de la neuropatia diabètica, en concret.

II.INTRODUCCIÓ

1. SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC

1.1. Anatomia dels sistema nerviós perifèric

El sistema nerviós és un conjunt de teixits especialitzats que controla accions i reaccions del cos i l'adaptació d'aquest al medi ambient. A diferència dels animals invertebrats, que tenen un sistema nerviós rudimentari, els animals vertebrats tenen un sistema nerviós altament complex.

El sistema nerviós dels vertebrats es divideix en dos parts principals: el sistema nerviós central (SNC) i el sistema nerviós perifèric (SNP). El sistema nerviós central consta de dues regions principals, el cervell i la medul·la espinal, englobades en estructures òssies, el crani i la columna vertebral, respectivament. Vinculats a les dues regions del sistema nerviós central trobem els nervis i ganglis, cranials, espinals i autònoms i les seves branques, que formen el sistema nerviós perifèric. A diferència del sistema nerviós central, el sistema nerviós perifèric no s'engloba en cap estructura òssia.

Als humans el sistema nerviós perifèric està format per 31 parells de nervis espinals (8 cervicals, 12 toràcics, 5 lumbar, 5 sacres i 1 coccígia), i 12 parells de nervis cranials (Figura 1). Els nervis espinals surten de la medul·la espinal i travessen els forats intervertebrals de la columna vertebral, on cada nervi espinal està connectat a la medul·la espinal per dos arrels, l'*arrel anterior* o ventral i l'*arrel posterior* o dorsal. L'arrel anterior consisteix en feixos de fibres nervioses *eferents* que condueixen els impulsos des del SNC a la perifèria, en canvi, l'arrel posterior o dorsal consisteix en feixos de fibres nervioses *aferents*, que transmeten impulsos nerviosos de la perifèria a SNC. Els cossos neuronals de les fibres nervioses eferents es localitzen a la regió ventral de la medul·la espinal, i els cossos neuronals de les fibres aferents es situen en un engruiximent de l'arrel dorsal anomenat *gangli de l'arrel dorsal* (DRG). Els nervis cranials tenen els cossos neuronals a l'encèfal (SNC), i les fibres nervioses que formen els nervis cranials surten de l'encèfal cap a la perifèria travessant diferents orificis presents al crani.

El sistema nerviós perifèric, com el central, està constituït pel teixit nerviós. Aquest presenta dos tipus cel·lulars principals: les neurones i les cèl·lules de la neuroglia. Les *neurones* són les cèl·lules implicades en la transmissió dels impulsos elèctrics i del processament de la informació; les *cèl·lules glials* o neuroglials realitzen funcions indispensables tant en el desenvolupament, com pel correcte funcionament del sistema nerviós madur. La neuroglia o glia són cèl·lules no excitables que fan de suport mecànic i metabòlic a la neurona i també desenvolupen tasques de defensa i protecció. Dins del grup de cèl·lules neuroglials trobem els

astròcits, els oligodendròcits (cèl·lules presents únicament a SNC), les cèl·lules de Schwann (cèl·lules presents únicament a SNP), la microglia i l'epèndima. Aquestes cèl·lules juguen un paper molt important quan es produeix lesió a sistema nerviós i en malalties que afecten al sistema nerviós.

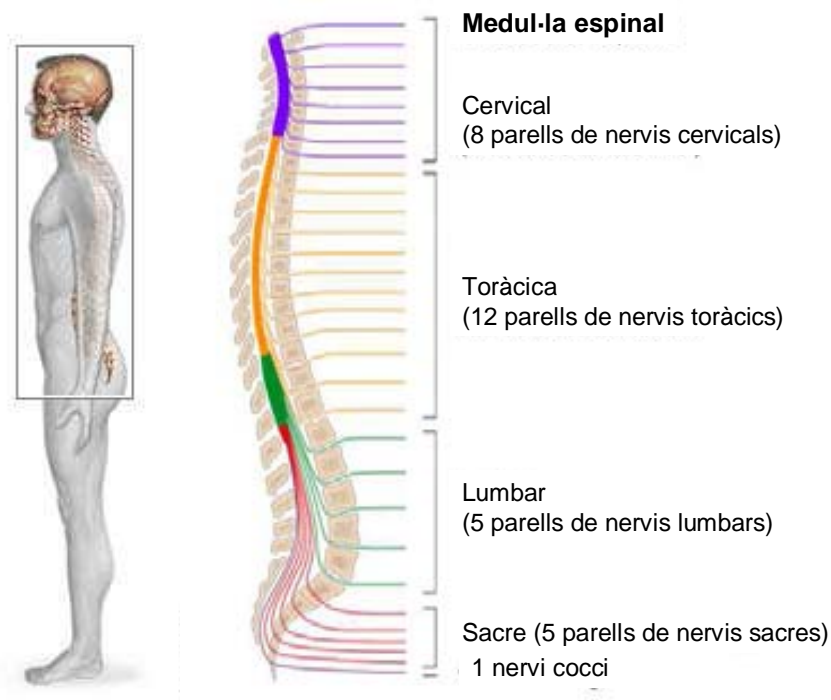


Figura 1: Esquema representatiu de la distribució dels nervis perifèrics al llarg de la columna vertebral adaptat de (Purves, 2004).

La neurona és la unitat funcional més important del sistema nerviós, té la capacitat de rebre, conduir i processar la informació d'entrada i, seguidament transmetre una resposta a un estímul o estímuls procedents tant del sistema nerviós central, com del perifèric (Figura 2).

Del cos d'una neurona s'estenen diferents branques una de les quals és més allargada i s'anomena axó. L'axó d'una neurona de SNP s'anomena fibra nerviosa. Els axons generalment s'agrupen en feixos nerviosos, depenent de si formen part del sistema nerviós central o perifèric s'anomenen de manera diferent. A sistema nerviós central són els *tractes nerviosos* i a sistema nerviós perifèric són els *nervis perifèrics*.

Les neurones *afereents* i *eferents* s'agrupen en feixos envoltats de teixit connectiu, formant els nervis perifèrics. L'arquitectura del feix varia en funció de la distància que recorre, és a dir, els feixos que recorren distàncies més llargues (nervis distals) tenen més presència de fibres nervioses que els feixos que recorren distàncies més curtes (nervis proximals). Els nervis perifèrics estan formats per tres capes: l'*epineuri*, el *perineuri* i l'*endoneuri*. L'*epineuri* és la

capa més exterior del nervi i està formada per un teixit laxa que conté els vasos sanguinis que irriguen el nervi; el *perineuri* envolta cadascun dels feixos que formen el nervi i consisteix en fines capes de cèl·lules reticulars i una capa externa de fibres de col·lagen. Té la funció de mantenir l'estructura del nervi, també actua com a barrera de difusió, ja que conté els vasos sanguinis que connecten amb els capil·lars sanguinis de l'endoneuri. La capa més interna que envolta el nervi és l'*endoneuri*, format per fibres reticulars, per col·lagen, per fibroblasts i per una matriu extracel·lular que ocupa els espais entre les fibres nervioses que formen el feix. Les fibres de col·lagen que trobem a l'endoneuri i que envolten cadascuna de les fibres nervioses donen lloc a la formació dels tubs endoneurals.

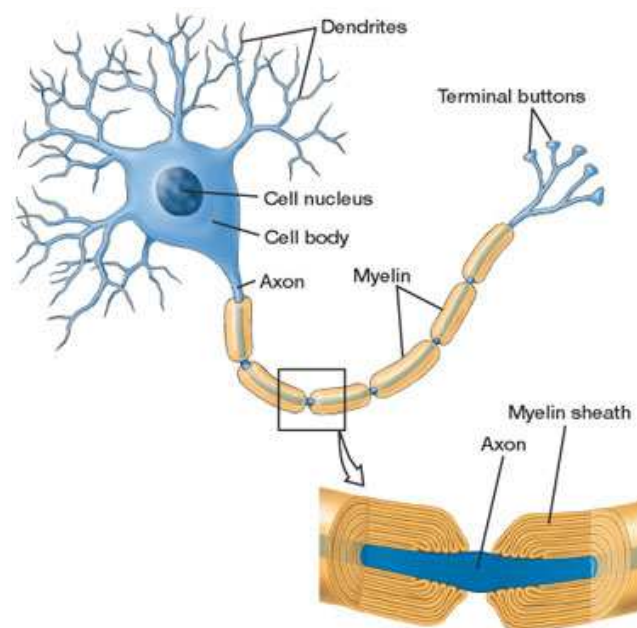


Figura 2: Esquema d'una neurona perifèrica envoltada per les cèl·lules de Schwann, que formen les beines de mielina.

1.2. Classificació i funció dels nervis perifèrics

El sistema nerviós perifèric està constituït per diferents tipus de neurones, les quals es poden diferenciar en funció d'on es localitzen els seus cossos neuronals. Les neurones aferents o neurones *sensorials* tenen el cos neuronal en el gangli de l'arrel dorsal, en canvi, les neurones eferents o *motores*, el seu soma neuronal es localitza a la regió ventral de la medul·la espinal.

1.2.1. Sistema nerviós perifèric motor

El sistema nerviós motor es divideix en dos grups principals: *sistema nerviós motor somàtic* i el *sistema nerviós motor autònom* (SNA). El sistema nerviós autònom es divideix en

dos subgrups, el SNA *simpàtic* i SNA *parasimpàtic*. La divisió entre simpàtic i parasimpàtic es deu a diferències anatòmiques, en la secreció de neurotransmissors i en els efectes fisiològics que tenen cadascun dels dos subgrups.

Les neurones motores o eferents donen lloc a les fibres nervioses motores, depenent de la regió del cos o òrgans que innerven tenen un diàmetre més o menys gran. Les fibres motores que innerven múscul esquelètic presenten un diàmetre axonal entre 10 i 17 μm . Per altra banda, si innerven feixos musculars (múscul llis) el diàmetre axonal és entre 3 i 8 μm . Generalment les fibres motores estan mielinitzades i la seva funció és la de transmetre la informació des del sistema nerviós central, on es troba el soma, a la resta del cos, principalment a través d'unions neuromusculars.

Estructura i localització de les neurones motores (LMN)

Les neurones motores (*Lower motor neurons*, LMN), que tenen els cossos neuronals localitzats a la medul·la espinal, formen part del sistema nerviós motor somàtic. Aquestes neurones, són neurones multipolars i contenen abundants cossos de Nissl, tenen el cos neuronal en forma ovoide, amb un diàmetre comprès entre 30 i 60 μm . Presenten un nucli central prominent i una elevada presència d'agregats de reticle endoplasmàtic granular. Generalment ocupen les zones ventrals i laterals de la regió ventral de la medul·la espinal i, tenen nombroses prolongacions i dendrites que emeten en diferents direccions. La major part dels axons de les neurones motores s'agrupen formant l'arrel ventral que surt de la medul·la espinal, on hi podem trobar un o més axons de les diferents neurones que la formen, i on la major part de les fibres axonals estan mielinitzades.

Trobem dos tipus de neurones motores (LMN): les σ -motoneurones (σ -MN) i γ -motoneurones (γ -MN). Les σ -motoneurones innerven les fibres musculars extrafusals i, responen a estímuls perifèrics de tensió per contracció, en canvi, les γ -motoneurones innerven fibres musculars intrafusals (extensió muscular), i juntament amb neurones sensorials aferents formen el sistema sensorial de posició (propiocepció) (Landon, 1976).

Sistema nerviós perifèric autònom (SNA)

El sistema nerviós autònom es divideix en SNA simpàtic i SNA parasimpàtic. Les dos parts que formen el SNA treballen conjuntament per mantenir un ambient intern estable, però tant funcionalment com anatòmicament són diferents.

El SNA simpàtic es distribueix àmpliament per tot el cos, innerva diferents parts com el cor, els pulmons, el múscul llis de molts vasos sanguinis, els fol·licles pilosos i les glàndules sudorípares. Té la funció de preparar l'organisme per a una emergència, augmentant la freqüència cardíaca i la contracció intestinal. A diferència del SNA simpàtic, el parasimpàtic realitza funcions contràries, és a dir, les seves activitats van dirigides a conservar i restablir l'energia, induint la disminució de la freqüència cardíaca, la contracció de les pupil·les i augmentant del peristaltisme i l'activitat glandular.

Els cossos neuronals dels nervis autònoms es troben als ganglis autònoms, aquest ganglis, tant simpàtics com parasimpàtics se situen a certa distància de la medul·la espinal i de l'encèfal, concretament es distribueixen entre els troncs simpàtics, els plexes autònoms paravertebrals i com a ganglis d'òrgans o prop d'ells.

Els ganglis autònoms estan envoltats per una capa de teixit connectiu, que continua amb l'epineuri i el perineuri del nervi perifèric. Estan formats per neurones multipolars, amb cossos cel·lulars irregulars. Les seves dendrites fan connexió sinàptica amb els axons mielínics de les neurones pre-ganglionars. Les fibres nervioses autònomes són fibres de diàmetre petit i no estan mielinitzades i innerven diferents òrgans, vasos sanguinis i glàndules sudorípares.

1.2.2. Sistema nerviós perifèric sensorial (SNS)

El sistema nerviós sensorial està format per fibres nervioses aferents, que formen els nervis sensorials. Les neurones aferents o sensorials tenen la funció de transmetre la informació rebuda de les diferents parts del cos, com estímuls que provenen d'òrgans interns i estímuls perifèrics, cap al SNC. Els axons de les neurones sensorials formen les fibres nervioses sensorials, aquestes poden estar o no mielinitzades i presenten uns diàmetres axonals entre 2 i 20 µm. Són neurones que finalitzen a la perifèria com a terminals lliures o en una varietat de receptors sensorials especialitzats, a pell, teixits i a òrgans interns.

Les neurones sensorials transmeten la informació que prové de receptors sensorials, situats principalment a la regió del cap, a la superfície corporal i a les extremitats del cos, fins a SNC. La informació transmesa, en general, es relaciona amb estímuls de temperatura, dolor, pressió i sentits com la visió, l'olfacte i el gust.

Els cossos de les neurones sensorials s'agrupen als DRG, que es distribueixen de manera simètrica al llarg de la medul·la espinal. Els ganglis sensorials de les arrels dorsals dels nervis espinals i dels troncs dels nervis cranials tenen la mateixa estructura. Cada gangli està envoltat per una capa de teixit connectiu que es continua amb l'epineuri i el perineuri del nervi perifèric.

Les neurones sensorials són neurones unipolars i presenten uns cossos cel·lulars arrodonits, amb una prolongació amielínica única, que posteriorment es bifurca en una unió en T, formant una ramificació que innerva la perifèria i una altra que entra a SNC. Els cossos de les neurones sensorials estan envoltats per una capa de cèl·lules planes anomenades cèl·lules capsulars o satèl·lit, amb una estructura i funció semblant a les cèl·lules de Schwann (Figura 3).

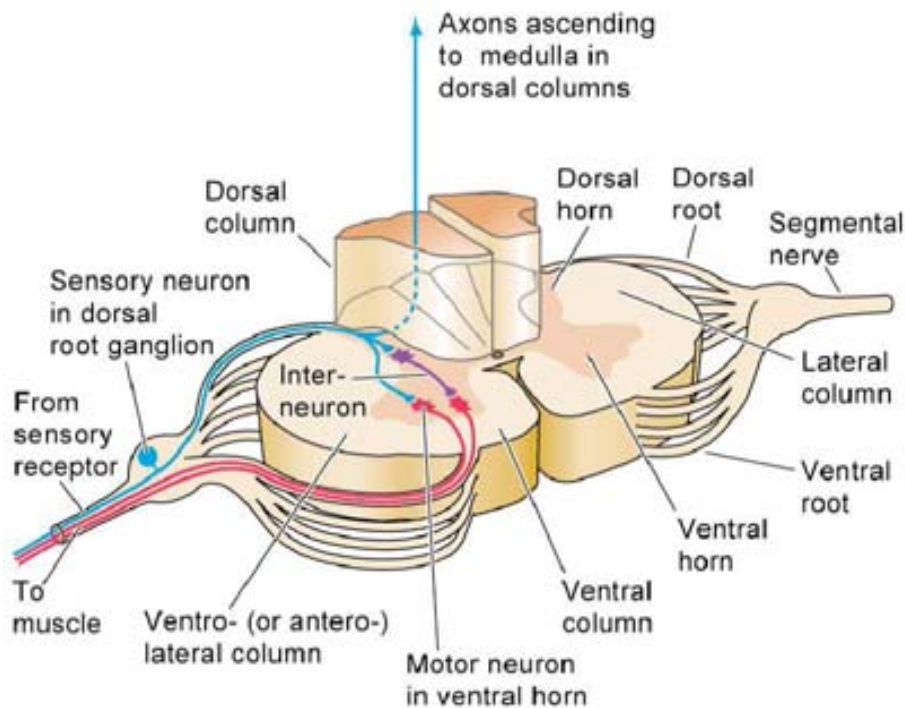


Figura 3: Esquema de la distribució de les neurones de sistema nerviós perifèric. En blau les neurones afèrents o sensorials i en vermell les neurones eferents o motores. Les neurones sensorials tenen el nucli localitzat als DRG, i les neurones motores a la regió ventral de la ME. La connexió entre neurones sensorials i motores es produeix per contacte directe o mitjançant interneurons (lila) que transmeten la informació de SNP a SNC i viceversa (Purves, 2004).

Classificació neurones sensorials primàries

Les neurones sensorials primàries o afèrents, presenten característiques anatòmiques i histoquímiques que ens permeten distribuir les neurones sensorials en diferents subpoblacions. El nombre de neurones per DRG i tipus de subpoblacions que el formen varia depenent de la localització anatòmica del nervi del qual formen part (Tandrup, 2004).

Les neurones sensorials es poden classificar segons la seva mida i morfologia, segons la velocitat de conducció i pels receptors sensorials que innerven. També es poden classificar en funció de marcadors específics per cada subpoblació neuronal.

Es distingeixen dos grups principals segons la mida de l'axó i la mielina. Les fibres grans mielinitzades (fibres A) i les fibres petites amielíniques (fibres C). Les fibres A són fibres mielinitzades i presenten velocitats de conducció nerviosa entre 1,2 – 40 m/s. Podem distingir dos subtipus de fibres A: les fibres (A β) que tenen un diàmetre axonal gran i amb un gruix important de les beines de mielina, són fibres conductores d'estímuls mecànics no nociceptius i principalment innerven fol·licles pilosos; i les fibres (A δ) tenen un diàmetre axonal mig i unes beines de mielina primes. Són fibres que condueixen estímuls mecànics nociceptius i presenten velocitats de conducció nerviosa més baixes que les fibres A β . Les fibres A δ finalitzen com a terminals lliures a epidermis (Smith and Lewin, 2009).

Les fibres C, són fibres no mielinitzades que finalitzen a la pell com a terminals lliures i presenten velocitats de conducció nerviosa baixa (0,3-1,2 m/s). Es poden classificar en funció de la conducció d'estímuls, totes elles responen a estímuls nociceptius, però podem distingir les fibres C de resposta polimodal, que responen a estímuls mecànics, químics i tèrmics, i les fibres C nociceptives, que només responen a estímuls nociceptius (dolor) (Figura 4).

Les fibres nociceptives es classifiquen també en funció de les característiques neuroquímiques. Les fibres C nociceptives polimodals, són neurones peptidèrgiques, responen a pèptids com CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) o substància P. Aproximadament un 35% de les neurones reaccionen a substància P i un 50% a CGRP (Gajda *et al.*, 2004). També trobem un petit percentatge de la subpoblació de neurones nociceptives que no responen a la presència de pèptids, són neurones que presenten afinitat per IB4. IB4 és una lectina que prové del llegum, *Griffonia simplicifolia*, i principalment transmeten estímuls propioceptius (Plato *et al.*, 2006).

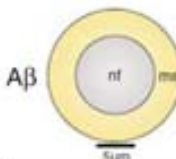


Fiber	Cross section	Fiber type	Sensation	%*	CV (m/s)	vFT (mN) [†]	Thermo-sensitivity [‡]
A β		RAM	Touch	10	>10	1.0	Light blue
		SAM	Touch	12	>10	1.5	Light blue
A δ		D-hair	Touch	6	2-10	<0.5	Light blue
		AM	Nociception	12	2-10	5	Red/Blue
C		C-polymodal	Nociception	30	<1.5	10	Red/Blue
		CM/MH/MC/H	Nociception	20	<1.5	6	Red/Blue
		"silent"	Nociception [†]	-5	<1.5	N/A	Red
		CLT	Touch [†]	-5	<1.5	<0.5	Light blue

Figura 4: Tipus de fibres cutànies de mamífer. CV: velocitat de conducció, vFT: Von Frey Llindar, mN: milinewtons, RAM: mecanoreceptors d'adaptació ràpida, SAM: mecanoreceptors d'adaptació lenta, AM: A δ -mecanonociceptor, CM: C-mecanonociceptor, CMH: C-mecanonociceptor de calor, CMC: C-mecanonociceptor de fred, CH C-nociceptor de calor i CLT fibres C de llindar baix, extret de (Smith and Lewin, 2009).

1.3. Glia del sistema nerviós perifèric

Les cèl·lules de Schwann (SC) són les cèl·lules glials del sistema nerviós perifèric i tenen la funció de donar suport mecànic i metabòlic a les neurones de SNP. Les fibres perifèriques estan envoltades per diverses SC, cosa que no s'observa a sistema nerviós central, on un oligodendròcit envolta més d'una fibra nerviosa. Tot i així, les SC presenten una estructura i funció comparables a les que presenten els oligodendròcits a SNC. Les SC formen unes beines al voltant dels axons de les neurones perifèriques.

Les SC són cèl·lules indispensables per al desenvolupament i supervivència neuronal, són també importants quan es produeix dany a SNP, doncs tenen la capacitat de controlar el procés de regeneració nerviosa i restaurar la funció de les fibres danyades. La regeneració nerviosa és un procés que només s'observa en fibres perifèriques i no en fibres de SNC.

A més de les SC, que són les principals cèl·lules de la glia a SNP, trobem també diversos tipus de glia perifèrica no tant nombrosa com: 1) les cèl·lules glials que envolten les neurones olfactivas, que representen una categoria especial de glia i tenen unes característiques semblants a les SC no mielinitzants; 2) la glia entèrica, localitzada als ganglis autònoms de l'intestí (sistema nerviós entèric), aquesta glia presenta complexes interaccions sinàptiques i una elevada capacitat integrativa estructural i bioquímica, molt semblant a la funció realitzada pels astròcits a sistema nerviós central; 3) les cèl·lules satèl·lit, són cèl·lules que envolten els cossos cel·lulars tant de neurones sensorials com autònomes, i a nivell de funció són semblants a les SC; 4) la glia terminal o teloglia, localitzada a les unions neuromusculars, on té la funció de regular la transmissió sinàptica i mantenir l'estabilitat de la unió neuromuscular.

1.3.1 Fibres nervioses amielíniques

Són fibres nervioses envoltades per SC no mielinitzants, sense mielina. Principalment són fibres nervioses amb diàmetres axonals petits com les fibres postganglionars del sistema nerviós autònom i algunes fibres nervioses sensorials associades al dolor.

Les SC no mielinitzants envolten axons de diàmetres de 1 μm o menor. Durant la formació de les fibres amielíniques, l'axó se situa dins d'una depressió que es forma a la superfície de la cèl·lula de Schwann, fins que queda totalment envoltat per les SC no mielinitzants. Una mateixa SC no mielinitzant pot tenir més d'una depressió i cada depressió pot contenir més d'un axó. Les SC no mielinitzants formen una estructura contínua que recobreix tot l'axó.

1.3.2. Fibres nervioses mielíniques

Les fibres nervioses mielíniques estan envoltades per SC que formen i produeixen *la mielina*. A SNC, les beines de mielina són sintetitzades pels oligodendròcits, no obstant, hi ha diferències estructurals i proteiques entre les beines de mielina de SNP i SNC.

La presència de beines de mielina envoltant les fibres nervioses els confereix una avantatge evolutiva, disminuint el diàmetre axonal, és a dir, els axons mielinitzants tenen una mida més petita, que els permet augmentar la velocitat de conducció nerviosa, per tant, accelerar la transmissió dels estímuls i de les respostes en el sistema nerviós.

La formació de les beines de mielina a SNP s'inicia quan la fibra nerviosa se situa pròxima a la SC, seguidament la fibra s'envolta per la membrana plasmàtica externa de la SC formant un mesoaxò, que sosté l'axó dins la SC, llavors la cèl·lula de Schwann envolta l'axó en una espiral i forma la beina de mielina. L'espessor de la beina de mielina depèn del nombre d'espirals que forma la membrana plasmàtica de la SC, i cada volta té entre 13 i 18 nm d'espessor.

1.4. La mielina

1.4.1. Estructura de la mielina

Quan s'observen talls transversals de beines de mielina, veiem que en la formació de l'espiral al voltant de l'axó, les capes proteiques externes i internes de la membrana plasmàtica de les SC es fusionen. La formació de l'espiral dóna lloc a un seguit de capes, constituïdes per lípids i proteïnes, que determinen l'estructura de la beina de mielina (Figura 5).

Les SC mielinitzants es distribueixen al llarg de l'axó de forma segmentada. Aquesta distribució proporciona aïllament elèctric de tot l'axó i augmenta la velocitat de conducció nerviosa. Entre SC i SC s'observa una regió, on la membrana axonal està descoberta. Aquestes regions s'anomenen *Nodes de Ranvier*. En aquestes regions la membrana plasmàtica de les espirals que formen les beines de mielina, no són tant compactes i s'observen reservoris de citoplasma cel·lular. A la regió de membrana axonal descoberta hi ha una elevada concentració de canals de sodi i potassi, aquesta disposició alterna i aïllada de les regions elèctricament excitable permet una conducció saltatòria dels estímuls elèctrics, que en axons mielinitzats és unes deu vegades major que en axons no mielinitzats (Pedraza *et al.*, 2001).

En talls longitudinals de fibres nervioses mielíniques podem observar unes estructures anomenades *incisures de Schmidt-Lanterman* (S-L). Són regions on hi persisteix citoplasma cel·lular de forma localitzada. Les incisures de S-L són una via per a la conducció i/o intercanvi de metabòlits des de la part més externa de la cèl·lula de Schwann fins l'axó.

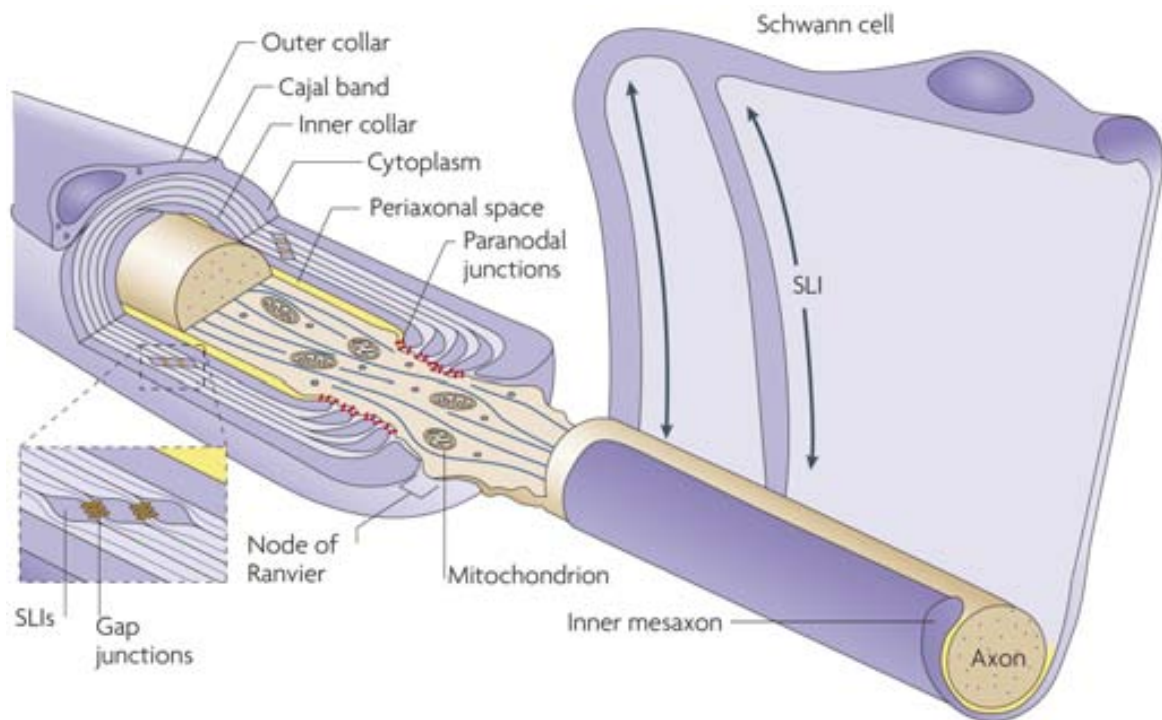


Figura 5: Dibuix d'una fibra nerviosa mielínica, envoltada per cèl·lules de Schwann. A la part esquerra del dibuix observem l'estructura de la mielina compacte que finalitza en un espai entre SC i SC que equival al Node de Ranvier. A l'ampliació de l'esquema s'aprecien les incisures S-L (SLIs) i les unions de tipus gap en els engruïments del citosol de les SC. A la part dreta del dibuix podem observar una representació de la mielina en formació (Nave, 2010).

Les SC deriven de cèl·lules pluripotencials de la cresta neural, que esdevenen en precursors cel·lulars, que es transformen en cèl·lules de Schwann immadures (Mirsky *et al.*, 2001; Jessen, 2004).

El pas de cèl·lules de Schwann precursors (SCp) a cèl·lules de Schwann immadures, fins a la formació de SC madures (les cèl·lules de Schwann mielinitzants i les cèl·lules de Schwann no mielinitzants), es duen a terme gràcies a diferents factors de transcripció. Els factors de transcripció que regulen el llinatge de les cèl·lules de Schwann (SCp) a SC mielinitzants i SC no mielinitzants són Krox-20 (Egr2), Oct-6 i Sox-10. Krox-20 és un factor de transcripció important en el pas de SCi a SC mielinitzants (Topilko, 2001). Oct-6 com Krox-20 també és important per el procés de mielinització. La diferència entre els dos factors de transcripció és que Krox-20 només es troba en cèl·lules mielinitzants mentre que Oct-6 es troba en les dues poblacions de SC. El factor de transcripció Sox-10 juga un paper important a l'inici del desenvolupament en les cèl·lules de la cresta neural, és un factor necessari pel desenvolupament de cèl·lules glials procedents de cèl·lules de la cresta neural (Jessen and Mirsky, 2005).

La diferenciació de les SCi a SC madures, depèn de la relació que s'estableix entre l'axó i la SCi, generant un intercanvi de senyals que determina el procés de diferenciació de les SC immadures a SC madures (mielinitzants i no mielinitzants) (Jessen and Mirsky, 2002). Els precursors de les SC requereixen de senyals axonals per sobreviure, mentre que les SC madures no. Un dels factors importants que intervé en la maduració i supervivència de SCp a SC madures és Neuregulina-1 (NGR1), un factor de creixement EGF-like (*endotelial growth factor-like*) que presenta diverses isoformes (Leimeroth *et al.*, 2002). La NRG 1 dels axons s'uneix i activa de receptor heterodimèric ErbB2/ErbB3 que es troba a les SC, l'activació del receptor activa la via de les MAPK, que estimula la proliferació, i PI3K/Akt per prevenir l'apoptosi (Atanasoski *et al.*, 2006).

A diferència de les SC immadures que requereixen senyals axonals per sobreviure, les SC madures són capaces d'inhibir les senyals apoptòtiques mitjançant la síntesi de factors de creixement com IGF (*Insulin-like growth factor*), PDGF-BB (*Platelet-derived growth factor-BB*) i NT-3 (neurotrofina-3). Aquests factors de creixement formen part d'un circuit autocrí que regula la supervivència de les SC (Jessen and Mirsky, 2005).

Durant el procés de mielinització es diferencien diversos marcadors específics com P0 i GAP 43 (*Growth-associated protein 43*). El gen de la mielina proteïna zero (mpz) és el major component i el més important pel procés de mielinització del SNP. La presència de P0 s'observa al llarg de tot el procés, però va augmentant amb el temps, fins a observar uns nivells d'expressió elevats a SC mielinitzants (Lee *et al.*, 1997).

Finalitzat el procés de maduració de les SC mielinitzants, s'activa la formació de les SC no mielinitzants. A diferència de les SC mielinitzants, predominantment expressen molècules com NCAM (*Neural cell-adhesion molecule*), p75 R (*Neurotrophin receptor*) i GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), que són marcadors específics de les SC no mielinitzants (Yu *et al.*, 2009).

1.4.2. Proteïnes de la mielina

Les beines de mielina estan formades en un 80% per lípids i un 20% per proteïnes. Els lípids formen la membrana plasmàtica de les cèl·lules de Schwann i les proteïnes de la mielina tenen una funció estructural, contribueixen en mantenir l'arquitectura de la beina de la mielina. Les proteïnes més importants de la mielina a sistema nerviós perifèric són: P0 (Proteïna zero de la mielina, MP0), MBP (Proteïna bàsica de la mielina), PMP22 (Proteïna 22 de la mielina perifèrica) i MAG (Glicoproteïna associada a la mielina).

La mielina esta formada per dos dominis: el domini compacte format per la línia densa periòdica i interperiòdica, que conté les proteïnes de la mielina P0, MBP i PMP22, i el domini no compacte situat als nodes de Ranvier i a les incisures de Schmidt-Lanterman. Aquest està format per les proteïnes MAG, connexina-32 i E-cadherina (Martini and Carenini, 1998).

Proteïna zero de la mielina (P0)

La proteïna zero de la mielina (P0) és el component estructural principal de la mielina perifèrica. La meitat del pes de la mielina equival a aquesta proteïna. És una proteïna de membrana de 30KDa que pertany a la subfamília de Ig-like (semblants a immunoglobulines). Presenta un únic domini transmembrana i dos dominis importants, un domini extracel·lular Ig-like i una regió intracel·lular. P0 conté N-glicans sulfatats, que funcionalment estableixen la línia intraperiòdica de la mielina compacta.

A ratolí s'ha demostrat que es necessita P0 per què la mielinització es realitzi correctament, per tant és una proteïna que té una funció crítica en el procés de mielinització (Martini *et al.*, 1995b). El mutant heterozigot per P0 s'utilitza com a model de la neuropatia perifèrica a humans per la malaltia de Charcot-Marie-Tooth tipus 1 (CMT1B). A humans s'han descrit unes 50 mutacions en el gen P0 que poden causar hipomielinització congènita (CH), síndrome Déjerine-Sotas (DSS) i CMTB1 (Wrabetz *et al.*, 2000; Wrabetz *et al.*, 2006).

Proteïna bàsica de la mielina (MBP)

La segona proteïna més abundant de la mielina a SNP és la proteïna bàsica de la mielina (MBP). Equival entre un 10 i un 20% del pes de la mielina, en canvi a SNC aquesta proteïna equival entre un 30 i un 40% del pes de la mielina. És una proteïna associada a membrana, presenta diferents mides (21KDa, 18KDa, 17KDa i 14KDa), depenent de *splicing* alternatiu i no es coneix la funció de les diferents isoformes. En ratolí la mutació espontània *shieverer*, que consisteix en una delació que va des de l'exó 3 al 7 i fa que la proteïna MBP no es trobi present a la mielina. Els animals que presenten aquesta delació moren abans dels 6 mesos d'edat, presenten hipomielinització de les fibres nervioses, però a nivell perifèric no s'ha observat alteració de l'estructura de la mielina, degut a un possible substitució de MBP per P0, fet que s'observa quan s'estudia el doble transgènic P0/MBP (Martini *et al.*, 1995a). En humans el síndrome 18q degut a una alteració en el cromosoma 18, a la regió on es troba el gen MBP, causa afectacions principalment a SNC degut a una disminució en la concentració de MBP a la mielina (Iester *et al.*, 1996).

Proteïna 22 de la mielina perifèrica (PMP22)

La proteïna 22 de la mielina perifèrica (PMP22) és una proteïna integral de membrana que constitueix un 5% del total de les proteïnes mielíniques perifèriques. Es localitza també al domini compacte de la mielina i està formada per quatre dominis transmembrana hidrofòbics (Martini, 1997).

A ratolí s'han trobat diferents mutacions espontànies d'aquests gen, les mutacions anomenades “Trembler”, que són mutacions puntuals i provoquen desmielinització del sistema nerviós perifèric, disminuint el gruix de la mielina i alterant la morfologia axonal. El ratolí homozigot per aquesta mutació és letal (Amici *et al.*, 2006). En humans la majoria de pacients que pateixen la malaltia de CMT1A presenten una duplicació de 1,5MB en el cromosoma 17, aquest inclou el gen de PMP22. D'altra banda la presència de quatre còpies del gen també estan associades a un fenotip sever de Déjerine-Sotas (DSS) amb neuropatia perifèrica. En canvi, la pèrdua d'una còpia del gen està associada a la neuropatia hereditària amb risc de paràlisi per pressió (HNPP) (Amici *et al.*, 2007).

Glicoproteïna associada a la mielina (MAG)

La glicoproteïna associada a la mielina (MAG) és una proteïna de 100KDa de pes, específica de les cèl·lules mielinitzants i constitueix un 1% del total de les proteïnes de la mielina. És una proteïna integral de membrana que presenta 5 dominis Immunoglobulina (Ig) i un domini intracel·lular. Es localitza majoritàriament a sistema nerviós central, tot i que, a sistema nerviós perifèric també hi és present, però amb menor quantitat (Toda *et al.*, 1994). La trobem en oligodendròcits i SC, sobretot a la membrana periaxonal. Presenta glicosilacions amb àcid siàlic, sulfat i GlcNAc (acetilglucosamina), i funcionalment intervé en les interaccions axó-glia i a les incisures de S-L. Generalment aquestes glicoproteïnes formen part de la superfamília de les immunoglobulines i sovint expressen l'epítip carbohidrat HNK-1 (*Human natural killer-1*), que intervé en les interaccions cèl·lula-cèl·lula.

Als ratolins knock-out per aquesta proteïna, ni l'estructura de la mielina ni el gruix estan alterats, fet que demostra que no és una proteïna essencial en el procés de mielinització. La manca de MAG fa que la compactació de la mielina no sigui total, però per pal·liar la pèrdua de MAG es sobreexpressen altres molècules d'adhesió (Yin *et al.*, 1998).

2. FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC

S'han descrit més de 100 tipus de neuropaties perifèriques. Els símptomes observats i les alteracions funcionals, depenen del tipus de nervi que es veu afectat (motor, sensorial o autònom).

La neuropatia perifèrica és una malaltia dels nervis perifèrics, inicialment es veuen afectats els nervis sensorials, com els associats al dolor, la temperatura i la pressió. L'afectació d'aquests nervis provoca l'aparició de diferents símptomes associats a neuropatia perifèrica, com una sensació de formigueig, cremor, inflor, pessigolleig i de dolor, a nivell de les extremitats, principalment a les extremitats inferiors (peus).

Les causes de la neuropatia perifèrica poden ser degudes a una lesió del nervi (trauma), a tumors, toxines, respostes autoimmunes, deficiències nutricionals, alcoholisme, desordres vasculars i metabòlics. Les neuropaties perifèriques es poden classificar en dos grans grup: les neuropaties perifèriques adquirides i les neuropaties perifèriques hereditàries.

Les neuropaties perifèriques adquirides són causades per malalties sistèmiques com la diabetis mellitus, per un trauma provocat per agents externs (fred-calor, radiació), infeccions o per desordres autoimmunitaris (Guillain-Barré), que afecten al teixit nerviós.

Per altra banda les neuropaties perifèriques hereditàries són degudes a mutacions genètiques o per causes innates que afecten al codi genètic, són neuropaties cròniques, és a dir, presenten desordres de sistema nerviós perifèric que no tenen cura i causen una incapacitat progressiva important. Els pacients de neuropatia perifèrica innata desenvolupen debilitat muscular, moviments inestables a l'hora de caminar i disfuncions sensorials, que s'accentuen progressivament. En aquests desordres del sistema nerviós perifèric hi poden estar implicats algun d'aquests gens: PMP22, P0 (MPZ), connexina 32 (cx32, GJB1) i Egr2 (Suter and Scherer, 2003). Podem distingir diferents tipus de neuropaties en funció del gen alterat i de la severitat del desordre neurològic causat, entre elles, diferents subtipus de la malaltia de CMT, HNPP, DSS i la hipomielinització congènita (CH).

2.1. Neuropatia Diabètica (ND)

La Neuropatia diabètica és la complicació més freqüent de la Diabetis Mellitus (DM). La diabetis mellitus és una malaltia amb una elevada repercussió personal i social degut a la seva prevalença, s'observa un increment de la morbiditat en pacients diabètics degut a les complicacions agudes i cròniques que comporta la malaltia, provocant una reducció de l'esperança de vida dels pacients. La prevalença de la DM ha augmentat dràsticament en els

últims 40 any fins a afectar un 5% de la població mundial. S'estima que en els pròxims anys s'incrementarà a mesura que augmenta el nivell de desenvolupament de la població mundial (Atkinson and Eisenbarth, 2001).

Els dos tipus de diabetis, DMT-I i DMT-II, desenvolupen complicacions cròniques (Sima, 2003). La hiperglucèmia és la causa principal de les complicacions associades a la diabetis però també el dèficit d'insulina, dèficit de pèptid C i alteracions en la funcionalitat i síntesi de factors tròfics, poden jugar un paper important en la fisiopatologia de la diabetis tipus I (Sugimoto *et al.*, 2000; Sima *et al.*, 2001).

Encara que es realitzi un tractament amb insulina per mantenir els nivells de glucosa en sang, a llarg plaç apareixen una sèrie de canvis estructurals i funcionals, dels diversos teixits i òrgans, que esdevenen en les complicacions cròniques de la DM. Les complicacions es poden classificar: com a microangiopàtiques (neuropatia, retinopatia i nefropatia diabètica), i macroangiopaties (cardiopatia isquèmica, arteriosclerosi cerebral i neuropatia diabètica en les seves diferents formes).

2.1.1. Diabetis Mellitus

La Diabetis mellitus (DM) és un trastorn multifactorial i multisistèmic, que té com a característica principal un augment crònic de la concentració de glucosa en sang (hiperglucèmia), que pot anar acompanyada de diversos símptomes (set, poliúria, pèrdua de pes i cansament) i que en absència d'un tractament efectiu pot arribar a produir-se coma diabètic i, fins i tot, la mort. Els nivells elevats de glucosa en sang són deguts a una defectuosa secreció i/o acció de la insulina, una hormona secretada per les cèl·lules β del pàncrees que, després d'una ingesta, té com a funció permetre l'entrada de glucosa, present a la sang, cap a les cèl·lules de diferents teixits, principalment fetge i múscul. La DM és una malaltia complexa que inclou diverses patologies, entre les quals coexisteixen un trastorn global del metabolisme dels hidrats de carboni, les grasses i les proteïnes.

Diabetis Tipus I

La Diabetis Tipus I també anomenada diabetis juvenil, perquè generalment s'inicia durant la infància o en persones menors de 30 anys, tot i que, també pot sorgir a qualsevol edat en un percentatge inferior. És la conseqüència de la destrucció de les cèl·lules β degut a processos autoimmunes o idiopàtics. El desenvolupament de la diabetis tipus I és gradual, passant varis anys abans no es manifesta clínicament. La malaltia es desenvolupa per un atac del sistema

immunitari contra les pròpies cèl·lules β del pàncrees, que són les cèl·lules encarregades de produir insulina. Aquest procés té diverses etapes: inicialment hi pot haver certa susceptibilitat o predisposició genètica, on hi poden haver varis gens implicats; també és necessària la presència d'un factor ambiental desencadenant, com una infecció vírica, l'estrès, toxines, etc., a partir de les quals es genera una resposta del sistema immunològic contra les cèl·lules β , que són destruïdes.

La resposta immunològica contra les cèl·lules β està generada inicialment per una resposta humoral, on es detecten anticossos contra proteïnes de la superfície de les cèl·lules β , com la descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD), una proteïna molt semblant a una proteïna del virus Cocksackie B, un virus potencialment implicat en el desenvolupament de la diabetis (Andreoletti *et al.*, 1997); la presència d'anticossos com els IA2, que van dirigits contra una fosfatasa present a l'interior de les cèl·lules β ; i anticossos contra la pròpia insulina. Aquests anticossos poden ser detectats en el sèrum de pacients mesos i anys abans dels desenvolupament de la malaltia, i han esdevingut marcadors d'un estat conegut com a pre-diabetis (Atkinson and Eisenbarth, 2001).

Les persones amb diabetis tipus I depenen de l'administració d'insulina per sobreviure. Menys del 10% dels afectats per la diabetis, pateixen diabetis tipus I.

Diabetis Tipus II

La diabetis tipus II també anomenada antigament com a diabetis no dependent d'insulina, es caracteritza per un mecanisme fisiopatològic complex. És el resultat d'un defecte de la producció de la insulina juntament amb a la resistència a l'hormona que presenten el fetge i teixits perifèrics com el teixit adipós i el muscular. En conseqüència, es crea resistència a la insulina la qual cosa implica un augment de la concentració de glucosa en sang. La resistència a la insulina pot ser deguda a una disminució de l'expressió del receptor de la insulina (IR) i a alteracions en la seva via de senyalització (Mandrup-Poulsen, 2003).

Generalment es presenta en edats més avançades i és unes deu vegades més freqüent que la diabetis tipus I. Té una elevada incidència familiar i en un 85% dels casos d'obesitat és freqüent que desenvolupin aquesta malaltia.

2.1.2. Fisiopatologia de la neuropatia diabètica

La neuropatia diabètica (ND) és una de les complicacions més freqüents de la DM, on s'observen danys a nervis perifèrics tant somàtics com autònoms, deguts a les condicions de hiperglucèmia/hipoinsulinèmia provocades per la diabetis. La prevalença i la incidència de la

neuropatia diabètica és clínicament significativa, pròxima al 60%, tot i així podem trobar alteracions electrofisiològiques gairebé al 100% dels pacients diabètics, encara que en molts d'ells la complicació sigui subclínica (Aguilar-Rebolledo, 2005). La poden patir tant pacients diabètics que tenen un control acurat dels nivells de glucosa en sang, com aquells pacients que no mantenen un control dels nivells de glucosa en sang.

La ND no sorgeix espontàniament, si no contràriament, es desenvolupa lentament i empitjora amb el temps. Aquesta condició es produeix majoritàriament en pacients diabètics diagnosticats des de fa temps. S'ha observat que entre un 60-70% dels pacients diabètics, presenten alguna tipus de neuropatia perifèrica. La neuropatia diabètica mostra efectes més severes en diabetis tipus I que en diabetis tipus II (Dyck *et al.*, 1999).

La neuropatia diabètica perifèrica (NDP) és una malaltia heterogènia que inclou una varietat de desordres que afecten a sistema nerviós perifèric. La NDP més comú és la polineuropatia distal sensorial, que es caracteritza per la degeneració de fibres sensorials i autònomes, a l'inici de la malaltia, i una lleugera pèrdua de fibres motores en estadis més avançats de la malaltia (Thomas, 1997).

Els mecanismes moleculars de la ND no estan ben caracteritzats. Hi ha evidències que una hiperglucèmia crònica causa dany a nervi, però aquest dany pot ser degut a una combinació de diversos factors com: 1.) Factors metabòlics, deguts a nivells alts de glucosa en sang, una llarga duració de la diabetis, nivells anormals de àcids grassos en sang i possiblement baixos nivells d'insulina, 2.) Factors neurovasculars, on s'observa dany a els vasos sanguinis que aporten oxigen i nutrients als nervis, 3.) Factors autoimmunitaris, que causen inflamació als nervis, 4.) Lesió mecànica dels nervis, com el síndrome túnel de carpià, 5.) Caràcters hereditaris com la susceptibilitat a malalties amb afectació a sistema nerviós i 6.) Hàbits com fumar i beure.

2.1.3. Simptomatologia i diagnosi

Des del punt de vista patològic en la neuropatia diabètica, l'afectació de la fibra nerviosa es distingeix per una degeneració progressiva i per un retard en el procés de regeneració de les fibres nervioses perifèriques. En funció de quins grups de nervis es veuen afectats, s'observen un o més senyals i símptomes, si es produeix lesió a nervis sensorials els símptomes predominants són dolor, rigidesa, formigueig, coïssor i pèrdua de la sensibilitat. L'aparició d'aquests símptomes són graduals i, s'inicien amb la sensació de coïssor i rigidesa als dits dels peus i, difon al llarg dels peus i cames. Ocasionalment la pell es torna molt sensible i aquest excés de sensibilitat causa dolor, també es produeix rigidesa a nivell dels peus o fins i tot una pèrdua total de la sensibilitat a aquests. La pèrdua de fibres sensorials i altres problemes associats a lesió del

nervi poden provocar l'aparició d'úlceres plantars, les quals necessiten cures constants per evitar una infecció i correcte cicatrització, i és la causa principal d'amputació no traumàtica.

Inicialment, els símptomes són graduals, però en etapes més avançades de la malaltia, el dolor és més intens i constant. Si els nervis afectats són motors, implicats en el controls de la tonicitat i resistència muscular, llavors es genera debilitat i/o paràlisi dels músculs controlats pels nervis afectats, a nivell de peus, els músculs no treballen correctament degut al desgast d'aquests i, aquest fet pot provocar pèrdua de l'equilibri. En canvi, si es veuen afectats els nervis autonòms que són els que controlen les funcions corporals involuntàries com, la sudoració i la digestió s'observen símptomes com la pell clivellada i peus extremadament secs.

Per diagnosticar la neuropatia diabètica perifèrica generalment es realitzen tests a nivell de peus i cames, on s'analitzen els reflexes, la capacitat de resposta a temperatura (calor) i vibració del pacient diabètic, si es requereix en alguns casos, també es realitzen tests neurològics.

El tractament de la neuropatia diabètica generalment es centra en mantenir un control acurat dels nivells de glucosa en sang dels pacients però, principalment la teràpia intenta pal·liar la simptomatologia. S'usen tractaments per alleujar els símptomes com el formigueig i la coïssor. Generalment els tractaments aplicats per aquesta malaltia són insatisfactoris. Els pacients també se sotmeten a teràpies físiques mitjançant estimulació elèctrica transcutània i acupuntura, per reduir els problemes d'equilibri i altres símptomes (Zochodne, 2000a).

Un control acurat de la hiperglucèmia disminueix la probabilitat de patir neuropatia diabètica, però no garanteix una prevenció de les complicacions associades a diabetis. De fet, fins i tot el transplantament de pàncrees no atura la degeneració de la ND (Navarro *et al.*, 1997).

2.1.4. Mecanismes moleculars de les complicacions de la Diabetis Mellitus

Els nivells elevats de glucosa generen alteracions bioquímiques que comporten canvis funcionals i estructurals que afecten el fenotip cel·lular. Tot i que els canvis metabòlics que es produeixen en condicions d'hiperglucèmia poden ser revertits, una progressió constant d'alteracions funcionals i metabòliques cel·lulars, suposen un dany cel·lular irreversible.

S'estableix una correlació entre alteracions metabòliques secundàries i la progressió de la neuropatia diabètica perifèrica i d'altres complicacions de la DM. La captació de glucosa a SNP no és dependent d'insulina, però tant les neurones com les SC es veuen afectades en condicions de hipoinsulinèmia i hiperglucèmia. En aquestes condicions s'observa un augment de glucosa circulant, que al mateix temps provoca un augment de la concentració intracel·lular de glucosa, alterant l'osmosi cel·lular. Aquests canvis afecten a nivell de teixit nerviós, on es veu afectada la

velocitat de conducció nerviosa sensorial i motora, i a sistema vascular, on s'observa una disfunció endotelial.

L'acumulació de glucosa a les cèl·lules activa un seguit de mecanismes cel·lulars, que amb el temps provoquen apoptosi cel·lular. Entre aquests hi ha quatre mecanismes moleculars importants que són: la via del polioli i l'increment del flux de sorbitol, un increment del flux de la via de l'hexosamina, provocant una modificació de proteïnes N-acetilglucosamina, l'activació de la proteïna quinasa C (PKC), que s'activa en condicions d'hiperglucèmia, i per últim, un augment de la formació d'AGEs (*Advanced glycation end products*) (Figura 6).

Via del polioli

Un punt important en l'alteració funcional i metabòlica de la cèl·lula és la via del polioli. L'enzim hexoquinasa s'encarrega de transformar la glucosa en glucosa-6-fosfat. En condicions de diabetis aquest enzim se satura degut a les elevades concentracions de glucosa, i s'activa la via del sorbitol, on l'enzim Aldosa Reductasa (AR) transforma la glucosa en sorbitol utilitzant com a cofactor el NADPH (donador de protons). A més, en aquest punt de la via també es generen concentracions importants de fructosa, ambdós productes sorbitol i fructosa es van acumulant a nivell intracel·lular, degut a la baixa permeabilitat de la membrana cel·lular a aquestes molècules, i això provoca un augment de la hiperosmolaritat cel·lular que finalment esdevé en estrès osmòtic cel·lular (Brownlee, 2005).

Les SC són cèl·lules riques en aldosa reductasa (Ludvigson and Sorenson, 1980). Aquest fet pot contribuir a que en condicions de diabetis i, conseqüentment a l'acumulació de sorbitol, suposin un augment de la patogeneicitat a les SC, provocant l'afectació neuropàtica i el desenvolupament de la neuropatia perifèrica en estadis inicials. L'Aldosa reductasa juga un paper important en la diabetis, activant la via de les MAPK a DRG, on es troben les neurones sensorials, primàriament afectades en neuropatia perifèrica (Tomlinson and Gardiner, 2008). Tant les MAPK com PARP (poly(ADP_ribose) Polymerase) estan implicats en la via de transcripció i regulació gènica de diferents factors (p53, NF- κ B). L'activació d'aquests factors suposa un augment de NOS (òxid nítric sintasa), cyclooxygenasa-2 (Cox2), CAM (*cell adhesion molecules*) i molècules inflamatòries, que provoquen estrès cel·lular (Manna *et al.*, 2010).

L'acumulació de sorbitol està també documentat en models murins de diabetis induïda per STZ, i descrit en ratolins ob/ob (Yagihashi *et al.*, 2001). L'augment de la via del polioli es manifesta en l'acumulació de sorbitol i fructosa a nervi ciàtic en models murins amb dietes riques en greixos (Obrosova *et al.*, 2007).

En estudis realitzats amb inhibidors de l'enzim Aldosa Reductasa AR (ARIs), s'observa una disminució de la hiperactivitat de AR, però no una inhibició de la via, la qual cosa disminueix el potencial terapèutic dels ARIs pel tractament de la neuropatia diabètica (Obrosova *et al.*, 2002; Cameron *et al.*, 2005).

La presència d'elevades concentracions de glucosa circulant, juntament amb la generació de radicals lliures, provoquen estrès oxidatiu a la cèl·lula. La via del polioli i l'enzim glutatió reductasa (GSH), comparteixen el cofactor NADPH. Aquest cofactor és necessari pel cicle del glutatió per mantenir el balanç entre la forma reduïda i oxidada del glutatió (GSH/GSSG). Un augment de sorbitol suposa una alteració de la ratio GSH/GSSG, disminuint els nivells de GSH. Aquest enzim també és necessari per l'acció de la superòxid dismutasa mitocondrial, per eliminar l'excés de peròxid d'hidrogen de la cèl·lula (Stevens *et al.*, 2000). Quan no es produeix la reacció del pas de peròxid d'hidrogen a aigua ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$), es generen radicals superòxid O_2^- provocant estrès oxidatiu a la cèl·lula. En diabetis, també es veu alterada la cadena de transport d'electrons i el cicle de l'àcid tricarboxílic. A mitocondri, la presència d'altres concentracions de glucosa genera una elevada presència de cofactors reduïts a la matriu mitocondrial i s'altera el seu potencial de membrana, provocant l'alteració del complex III de la cadena de transport d'electrons, augmentant la vida mitja del coenzim Q i provocant un augment de radicals superòxid (Srinivasan *et al.*, 2000; Brownlee, 2001). Els radicals O_2^- i H_2O_2 a nervis perifèrics, poden reaccionar amb nitrit i generar peròxid nítric, la presència de NO a la cèl·lula provoca dany al DNA, activant l'enzim nuclear poly(ADP_ribose) Polymerase (PARP), que disminueix la concentració cel·lular del seu substrat NAD, la qual cosa alenteix la glucòlisi, la cadena de transport d'electrons i disminueix la formació d'ATP, fins arribar a causar la mort cel·lular (Obrosova, 2005).

Increment de l'activitat de la via Hexosamina

En condicions de normoglicèmia la glucosa és eliminada via glucòlisi per l'enzim hexoquinasa, formant el productes glucosa-6-fosfat, seguit de fructosa-6-fosfat. En canvi, en condicions d'hiperglicèmia, l'excés de fructosa-6-fosfat (produïda a la glucòlisi), entra a formar part d'una via enzimàtica, la via de l'hexosamina, on l'enzim glutamina fructosa-6-fosfat amidotransferasa converteix la fructosa-6-fosfat a glucosamina-6-fosfat i finalment a uridina difostat N-acetilglucosamina (UDP-GLcNac). La UDP-GLcNac reacciona amb residus serina/treonina de diferents factors de transcripció, provocant canvis patològics a l'expressió gènica, augmentant l'expressió de la citoquina proinflamatori TGF- β 1 (Laposa *et al.*, 2003).

Activació de PKC

L'hiperglucèmia augmenta els nivells intracel·lulars de Diacilglicerol (DAG). Aquest és un cofactor crític perquè activa diferents isoformes de PKC. Quan PKC és activada, pot actuar en moltes proteïnes diana alterant els nivells de senyalització i regulació cel·lular.

En rates diabètiques s'activa a nivell del vasa nervorum, i el mateix succeeix en ratolins diabètics. En diabetis disminueix l'activitat de PKC a DRG, aquests canvis s'associen a una reducció de l'expressió i l'activitat de la isoforma α -PKC (Cameron *et al.*, 1999; Yamagishi *et al.*, 2003).

Increment de la formació i senyalització AGEs (*Advanced glycation end-products*)

Una altre conseqüència de la hiperglucèmia és la glicació no enzimàtica de proteïnes, una reacció no enzimàtica que es produeix entre molècules de glucosa, derivats de la sacarosa i α -oxoaldehids, i grups lisina d'altres proteïnes, nucleòtids i lípids, formant productes estables, com les fructosamines com: EGA (*early glycation adducts*) i els AGEs (*Advanced glycation end-products*). Els AGEs són la combinació de processos de glicació i oxidació (glicooxidació), formats per proteïnes extracel·lulars circulants que tenen la capacitat d'induir respostes cel·lulars a través de receptors per AGEs, RAGE (Jakus and Rietbrock, 2004).

Els AGEs causen dany cel·lular a través de tres mecanismes: 1) mitjançant la modificació de proteïnes intracel·lulars, com les proteïnes involucrades en regulació de la transcripció gènica; 2) tenen la capacitat de difondre a través de la membrana plasmàtica i actuar sobre les proteïnes de la matriu extracel·lular, modificant-les, i causant disfunció cel·lular, i per últim, 3) poden modificar proteïnes intracel·lulars i extracel·lulars alterant la producció de citocines inflamatòries i factors de creixement, provocant dany a les cèl·lules i als teixits.

Els receptors dels AGEs estan presents a diferents tipus cel·lulars com macròfags, adipocits, cèl·lules endotelials i cèl·lules del múscul llis, i fan de mitjancers de molts dels efectes biològics dels AGEs. Aquests receptors són membres de la família immunoglobulines de receptors multiligand, involucrades en senyals de transducció intracel·lular, tenen la funció de promoure la resposta inflamatòria, l'apoptosi, l'expressió de molècules d'adhesió i l'estrès oxidatiu.

A nervi perifèric, els receptors d'AGEs es localitzen en l'endoteli i a SC. S'ha observat en nervis de ratolins diabètics, que canvis electrofisiològics i estructurals progressius són deguts majoritàriament a un augment i a una acumulació de mRNA de RAGE, sobretot a SC i a DRG (Toth *et al.*, 2008). Concentracions elevades de AGEs indueixen apoptosi a les SC, també afecten al potencial de membrana mitocondrial, i fan d'encebadors per la producció de

citoquines inflamatòries com TNF- α . A més a més, un augment dels nivells d'AGEs a dermis correlaciona amb manifestacions clíniques de neuropatia diabètica. També s'observen acumulacions d'AGEs a la pell, saliva i sèrum (Garay-Sevilla *et al.*, 2005).

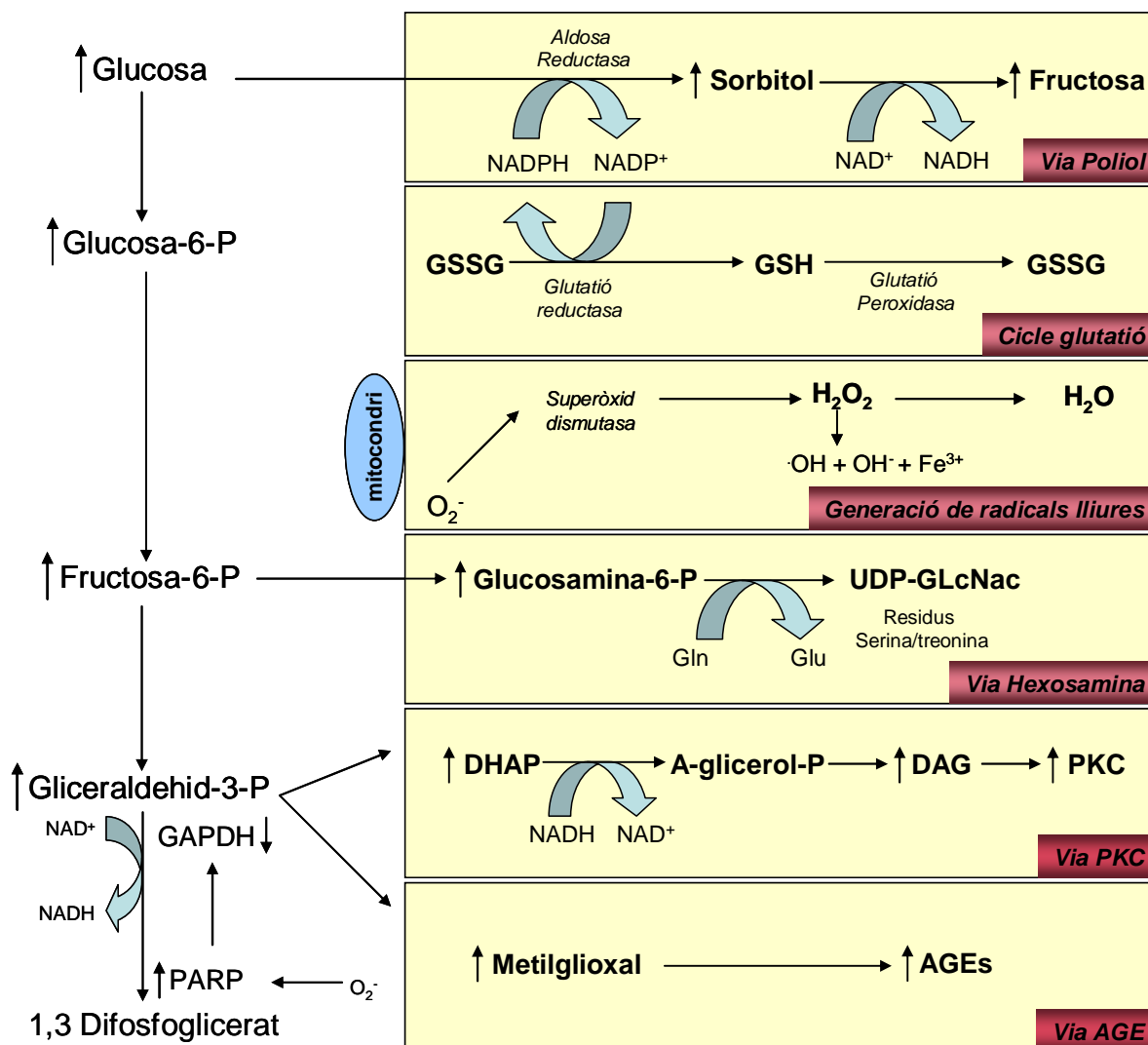


Figura 6: Connexió de les vies de metabolització secundària de la glucosa, activades en condicions d'hiperglucèmia. Les vies activades per glucosa i intermediaris de glucòlisi, augmenten la via del poliol que converteix la glucosa a sorbitol utilitzant l'enzim aldosa reductasa i NADPH com a donador. NADPH també és utilitzat per l'enzim glutatió reductasa per mantenir el balanç (GSH/GSSG). Increment de producció de superòxid a mitocondri. Entrada de la fructosa-6-fosfat a la via de l'hexosamina per formar UDP-GlcNac. Via Gliceralehid 3 fosfat es sintetitza DAG que activa PKC, alterant la transcripció gènica i la formació de AGEs, provocant canvis estructurals i funcionals a la cèl·lula. Adaptació de (Tomlinson and Gardiner, 2008)

Recentment, s'ha suggerit la unificació de les diferents vies comentades anteriorment, com un procés mediat per la hiperglucèmia on es produeix l'acumulació de radicals superòxid. Aquests inhibeixen l'enzim glucolític GAPDH (Gliceralehid-3-fosfat deshidrogenasa), provocant l'acumulació de metabolitzats que acaben activant les diferents vies i provocant dany cel·lular (Brownlee, 2005).

L'estrès oxidatiu causat per una desregulació entre molècules ROS i la neutralització d'aquestes és un mecanisme implicat en neuropatia diabètica i altres complicacions de la diabetis. Els antioxidants com α -lipòic i la descomposició catalítica de peròxids d'hidrogen no són suficients per reduir la concentració de glucosa i dels intermediaris via sorbitol a nervi perifèric (Low *et al.*, 1997).

2.1.5. Degeneració walleriana i regeneració del nervi perifèric

Quan es produeix una lesió del cos de la cèl·lula nerviosa, degut a un traumatisme, una interferència en la irrigació o una malaltia, es pot produir la degeneració de tota la neurona, incloent les seves dendrites i terminacions sinàptiques. Si la lesió es produeix a la prolongació de la cèl·lula nerviosa succeeixen un seguit de canvis degeneratius, afectant al segment distal (part inferior de la zona de lesió), al segment proximal (part superior a la zona de lesió), i possiblement també al cos cel·lular on neix l'axó.

La lesió a nervi causa una ruptura de fibres nervioses, una disrupció dels axons i una desdiferenciació de les SC mielinitzants, llavors s'inicia un procés de degeneració que s'anomena *degeneració walleriana*. La degeneració walleriana s'inicia a la regió distal de la lesió. Els primers signes de degeneració apareixen 24 hores després de la lesió. En aquest punt, l'axó presenta un aspecte inflammat i irregular. Passades unes 48 hores de la lesió, els axons lesionats pateixen un seguit de canvis estructurals i morfològics, com la desintegració del citoesquelet. La beina de mielina de les SC es va degradant lentament i apareixen gotetes de lípids dins el citoplasma, que posteriorment són expulsades i fagocitades per els macròfags tissulars. Els macròfags hi arriben atrets per citoquines inflammatòries com LIF (*leukemia inhibitory factor*), IL-1 α i IL-1 β , secretades per les cèl·lules de Schwann presents al lloc de la lesió (Vargas and Barres, 2007).

Per una correcta regeneració dels nervis perifèrics són necessaris dos requisits importants, la persistència del tub endoneurial i la capacitat de les cèl·lules de Schwann per activar la regeneració nerviosa. A partir d'aquest moment les SC es desdiferencien i comencen a proliferar ràpidament, gràcies a una membrana basal persistent després de la lesió. Les SC es col·loquen dins la membrana basal formant uns cordons paral·lels anomenats *bandes de Bügner*, que són necessàries per una correcta regeneració axonal. La proliferació de les SC continua unes dues setmanes post-lesió i va disminuint progressivament (Stoll and Muller, 1999).

Per dur a terme la regeneració són necessaris un seguit de canvis metabòlics que afavoreixen el procés. S'inicia amb la degeneració walleriana i es produeixen un seguit de canvis

morfològics en el cos neuronal, com la dissolució dels cossos de Nissl, desplaçament del nucli del centre, allargament dels nucleols, arrodoniment del soma neuronal i regressió de les dendrites. També es produeix una reacció retrògrada on s'activa la cromatolisi neuronal, que en ocasions pot eliminar la capacitat de regeneració (neuroma).

Les SC presents a la regió distal de la lesió juguen un paper molt important en la regeneració, incrementant la síntesi de molècules d'adhesió CAMs (*surface cell adhesion molecules*) com N-CAM, Mg-CAM, N-cadherina i L2/HNK-1, elaborant una membrana basal amb un ampli contingut de proteïnes de la matriu extracel·lular (laminina, fibronectina i tenascina) i produint factors neurotròfics i els seus receptors (Fu and Gordon, 1997).

L'elongació de l'axó requereix la presència de factors tròfics i tròpics, necessaris per estimular i controlar la regeneració axonal. Les SC i la matriu extracel·lular presents al segment distal de la lesió, són la font principal dels factors necessaris per la regeneració (Webber and Zochodne, 2010). El creixement dels axons, tant motors, sensorials i autònoms, s'inicia al segment proximal de la lesió. Les SC presents a la regió distal secreten diversos factors estimulants del creixement que activen la regeneració dels axons lesionats, com BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), GDNF (*Glial-derived neurotrophic factor*), CNTF (*Ciliary neurotrophic factor*), LIF (*leukemia inhibitory factor*), FGF (*Fibroblast growth factor*) i IGF (*Insulin-like growth factor*) (Liu and Snider, 2001; Chen *et al.*, 2007). Tanmateix els axons modulen els nivells d'expressió dels receptors d'aquests factors per respondre millor a les condicions de regeneració (Ebadi *et al.*, 1997). En ratolins amb lesió (*crush*) es va observar un augment de mRNA de GDNF i del seu receptor GFR- α 1, també un augment de l'expressió dels receptors TrkB, p75R, CNTFR i LIFR (Boyd and Gordon, 2003). L'activació dels receptors de factors neurotròfics indueixen una forta regulació i activació de PI3K al conus de regeneració, aquest fosforila i inactiva GSK-3, promovent el creixement axonal (Chen *et al.*, 2007).

La formació del conus de regeneració s'estimula entre 3 i 24 hores després de la lesió. L'axó lesionat genera múltiples brots o conus de regeneració, que desapareixen quan els axons han regenerat del tot. Els axons en regeneració penetren a la regió distal, entre 1 i 2 dies després de la lesió, aquests es disposen dins les bandes de Bügner, formades per les SC i continuen la regeneració fins a adquirir la mida que tenien inicialment. Un punt clau en la generació del conus de regeneració és l'augment de l'expressió de la proteïna GAP43, la seva síntesi s'indueix just després de la lesió i activa la formació i posterior progressió del conus de regeneració. En condicions normals GAP43 és sintetitzada per neurones sensorials petites, però en condicions de lesió s'expressa a totes les neurones localitzades a DRG, a neurones motores i també pot expressar-se a cèl·lules de Schwann no mielinitzants.

La capacitat de regeneració dels nervis lesionats i la supervivència d'aquests depèn de varis factors com: la distància del lloc de la lesió del soma neuronal, l'edat de l'individu que pateix la lesió i la severitat de la lesió, tot i així, si la lesió es produeix pròxima al soma de la neurona, pot provocar més mort neuronal que no pas si la lesió es produeix en regions més distals del soma de la neurona (Xu *et al.*, 2008).

Durant el procés de degeneració-regeneració, a nivell de la regió distal es produeix un augment de col·lagen a l'endoneuri, provocant una disminució del diàmetre del tub endoneurial i facilitant la re-direccionalitat dels axons en regeneració. En la regió proximal del lloc de la lesió, els canvis que es produeixen a l'axó són similars als de la regió distal, però només degeneren fins al primer node de Ranvier persistent després de la lesió. Si la lesió a nervi perifèric provoca la secció complerta d'aquest, s'activa la degeneració del nervi lesionat, però la falta d'una membrana basal per guiar el procés de regeneració fa que el nervi no regeneri correctament. En aquest cas l'axó i les SC són substituïdes per el teixit fibrós cicatritzant, que produeixen els fibroblasts locals i no es recupera ni l'estructura ni la funcionalitat del nervi intacte (Landon, 1976).

El sistema nerviós central no té la capacitat de regenerar quan es produeix una lesió. En aquest cas, les restes neuronals i els fragments de mielina són fagocitades per cèl·lules microgials i els astròcits substitueixen la neurona formant un teixit cicatritzant. (Delgado-García, 2004).

2.1.6. Diabetis i Regeneració

La diabetis afecta a la capacitat regenerativa dels nervis perifèrics, generant un ambient desfavorable per activar la regeneració i una progressió adequada d'aquesta. Les alteracions funcionals i metabòliques observades en diabetis alteren el procés de degeneració-regeneració nerviosa, provocant una pèrdua massiva de fibres nervioses, degut a l'alteració en el procés de degeneració walleriana.

En diabetis el transport axonal es veu afectat, aquest fet altera la regeneració nerviosa, s'observen canvis a nivell de citoesquelet que provoquen una disminució de l'elongació i remielinització dels axons, per tant una disminució del gruix de la mielina i del diàmetre axonal, i en conseqüència la no regeneració de les fibres nervioses. Els mecanismes que causen neuropatia contribueixen a alterar el procés de regeneració, però probablement altres canvis provocats per la diabetis també poden estar implicats en la desregulació degeneració-regeneració nerviosa. Per exemple canvis estructurals a la microvasculatura, divisió de les cèl·lules

endotelials, tancament de capil·lars i pèrdua del gruix de la làmina basal que envolta les fibres nervioses, provocant una excessiva resposta vasoconstrictora i condicions d'hipòxia augmentarien l'estrès oxidatiu.

Quan es produeix lesió a nervi perifèric i posterior regeneració, hi intervenen diferents tipus cel·lulars com les SC i macròfags. Els macròfags també es veuen afectats per les condicions d'hiperglucèmia, disminuint la seva funcionalitat i capacitat de migració quan es produeix lesió. Els macròfags, a més a més són capaços de sintetitzar NO, important sobretot en funcions com la vasodilatació (*vasa nervorum*) i peroxidació lipídica, provocant una deficiència en l'eliminació de les restes de mielina produïdes en lesió nerviosa i un retard, fins i tot inhibició, de la regeneració. La presència de mielina persistent al lloc de la lesió, probablement és una de les causes de la inhibició de la regeneració.

Com ja s'ha explicat les, SC en diabetis pateixen un seguit de canvis morfològics i funcionals que els causen un dany directe, provocant que les SC perdin la capacitat de sintetitzar els factors tròfics necessaris per la correcta regeneració axonal i posterior mielinització. Un punt limitant en la regeneració axonal en diabetis és la manca de la síntesi de proteïnes implicades en regeneració, com GAP43, la disminució de la síntesi de neuropèptids com CGRP i substància P, i neurotrofines com NT3 i IGF-I, principalment. La presència de factors tròfics és essencial per la supervivència neuronal després de la lesió i les SC i els macròfags juguen un paper important en la síntesi d'aquests factors neurotròfics (Zochodne and Cheng, 2000).

Altres mecanismes implicats en la inhibició de la regeneració són una presència persistent de la làmina basal, en estadis avançats de regeneració (Bradley *et al.*, 1995), una excessiva fosforilació de la proteïna neurofilament, que crea resistència a la degeneració axonal després de la lesió, per tant, alentiment de la degeneració walleriana i una alteració en la despolarització de la membrana mitocondrial a SC i a neurones, provocant també un retard i fins i tot, inhibició de la regeneració en diabetis (Kennedy and Zochodne, 2005).

3. FACTOR DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA I (IGF-I)

Els factors neurotròfics són proteïnes que promouen específicament la supervivència de les neurones, tot i que, alguns factors neurotròfics també presenten efectes a nivell de morfologia i fisiologia neuronal. Realitzen la seva funció mitjançant la regulació de l'expressió gènica.

Les neurotrofines juguen un paper important en el correcte desenvolupament i en el manteniment de les estructures de sistema nerviós perifèric. Dins de la família de neurotrofines, destacariem NGF (*Nerve growth factor*), BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) i les neurotrofines NT-3 i NT-4/5. Cadascun d'aquests factors presenta un tropisme neuronal específic, on l'especificitat neuronal ve donada per receptors específics expressats per cada població neuronal (Apfel, 1999).

Altres factors igualment importants per la supervivència neuronal són CNTF, GDNF i factors de la família de IGFs (IGF-I, IGF-II i insulina). Entre ells destacariem els IGFs (IGF-I i insulina), que presenten efectes importants en supervivència, proliferació i inhibició de l'apoptosi a sistema nerviós perifèric i central.

IGF-I (Insulin Like growth factor-1/ factor de creixement similar a la insulina-1), és un factor de creixement fetal i postnatal important, implicat en homeòstasi tissular mitjançant la regulació de la proliferació, la diferenciació i la supervivència cel·lular. IGF-I participa a nivell de fisiopatologia, en malalties neurodegeneratives, càncer i en una àmplia varietat de desordres.

IGF-I és una cadena polipeptídica d'uns 70 amino àcids, estructuralment semblant a la insulina, se sintetitza principalment a fetge com a resposta a hormona del creixement GH, i també en diferents teixits, incloent el sistema nerviós central i perifèric. La concentració d'IGF-I a sang és de 10 a 500 ng/ml.

IGF-I és necessària pel creixement postnatal i també estimula el creixement i el desenvolupament d'òrgans, com el múscul esquelètic, el cervell i les glàndules mamaries. IGF-I té efectes importants en proliferació cel·lular i apoptosi, fet que indica que aquest pèptid està implicat en la regulació de l'homeòstasi tissular.

Els sistema IGF-I comprèn tres lligands la insulina, IGF-I i IGF-II, els seus respectius receptors, i sis proteïnes d'unió a IGFs (IGFBPs), que modulen la bioactivitat, la vida mitja i la biodistribució de IGFs. IGF-I presenta alta afinitat per el seu receptor, IGF-IR i, menys afinitat pel receptor de la insulina, en canvi, IGF-II té alta afinitat pel seu receptor IGF-IIR, i també presenta elevada afinitat pel receptor d'IGF-I. El receptor d'IGF-II, és un receptor manosa-6-

fosfat dependent de cations, no presenta cap funció de senyalització i, probablement serveix per regular el nivells d'IGF-II.

3.1. Sistema de senyalització d'IGF-I via Receptor (IGF-IR)

IGF-IR és una tirosina quinasa multifuncional associada a membrana, juga un paper important en proliferació cel·lular, diferenciació, reparador de dany en el DNA i protecció davant d'apoptosi. El gen d'IGF-IR es localitza al cromosoma 15q26 i codifica per un únic polipèptid que té un 70% d'homologia amb el receptor de la insulina (IR). IGF-IR madur consisteix en un receptor heterotetramèric amb dos subunitats α extracel·lulars, que contenen regions d'unió a lligand riques en cisteïna, i dos subunitats β amb dominis extracel·lulars i transmembrana, ambdós subunitats estan unides per ponts disulfur, i una regió citoplasmàtica que conté un domini tirosina quinasa i un domini C-terminal. Dels tres lligands naturals, IGF-I, IGF-II i insulina, que són capaços d'unir-se a IGF-IR, IGF-I s'uneix al receptor amb elevada afinitat ($K_D = 1\text{nM}$); seguit d'IGF-II ($K_D = 15\text{--}20\text{nM}$) i insulina ($K_D = 100\text{nM}$) que la seva unió és menys efectiva (Figura 7).

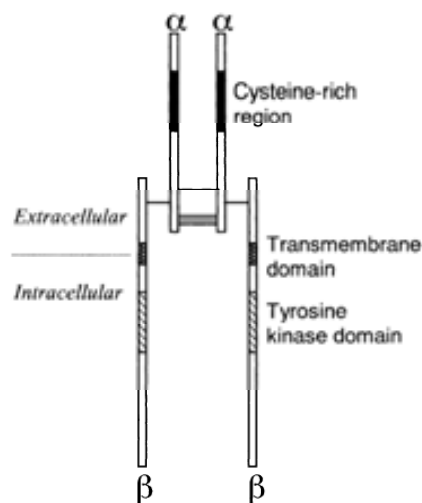


Figura 7: Estructura del receptor d'IGF-I. El IGF-IR és un receptor tirosina quinasa, que conté múltiples llocs intracel·lulars d'autofosforilació. Les dos subunitats que formen el receptor α i β estan unides per ponts disulfur (Vincent and Feldman, 2002).

La unió a lligand esdevé amb la clusterització del receptor i l'autofosforilació dels residus tirosina de les subunitats β del receptor (LeRoith *et al.*, 1995). L'activació del receptor IGF-IR suposa l'activació de diverses cascades de senyalització, que regulen senyals de replicació i reparació del DNA i diversos senyals antiapoptòtics. L'autofosforilació dels receptors causa el reclutament dels IRS-1/2 (*insulin receptor substrate -1 i-2*), els IRS són fosforilats, i

seguidament activen diferents vies de senyalització (Dudek *et al.*, 1997). Una de les principals vies de senyalització és la via PI3K/Akt, l'activació de PI3K (Fosfatidil inositol 3 quinasa) fa augmentar els nivells de PIP3 (Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat) que esdevenen amb la unió a Akt/Proteïna quinasa B (PKB) mitjançant el seus dominis PH (*pleckstrin homology domain*) i l'activen. Akt/PKB activada, actua a nivell d'expressió gènica regulant l'expressió de gens de supervivència i proliferació cel·lular (Figura 8) (Parrizas *et al.*, 1997).

La segona via de senyalització més important és via de les MAPK (*Mitogen activated protein kinase*), dins la família de proteïnes activades per mitògens, s'activen les isoformes ERK1/2, que també actuen a nivell de la regulació gènica (Parrizas *et al.*, 1997; Cui and Almazan, 2007). Una via de senyalització addicional d'IGF-IR és la via que activa les quinases p38, JNK i mTOR, que intervenen principalment en processos d'apoptosi cel·lular (Floyd *et al.*, 2007).

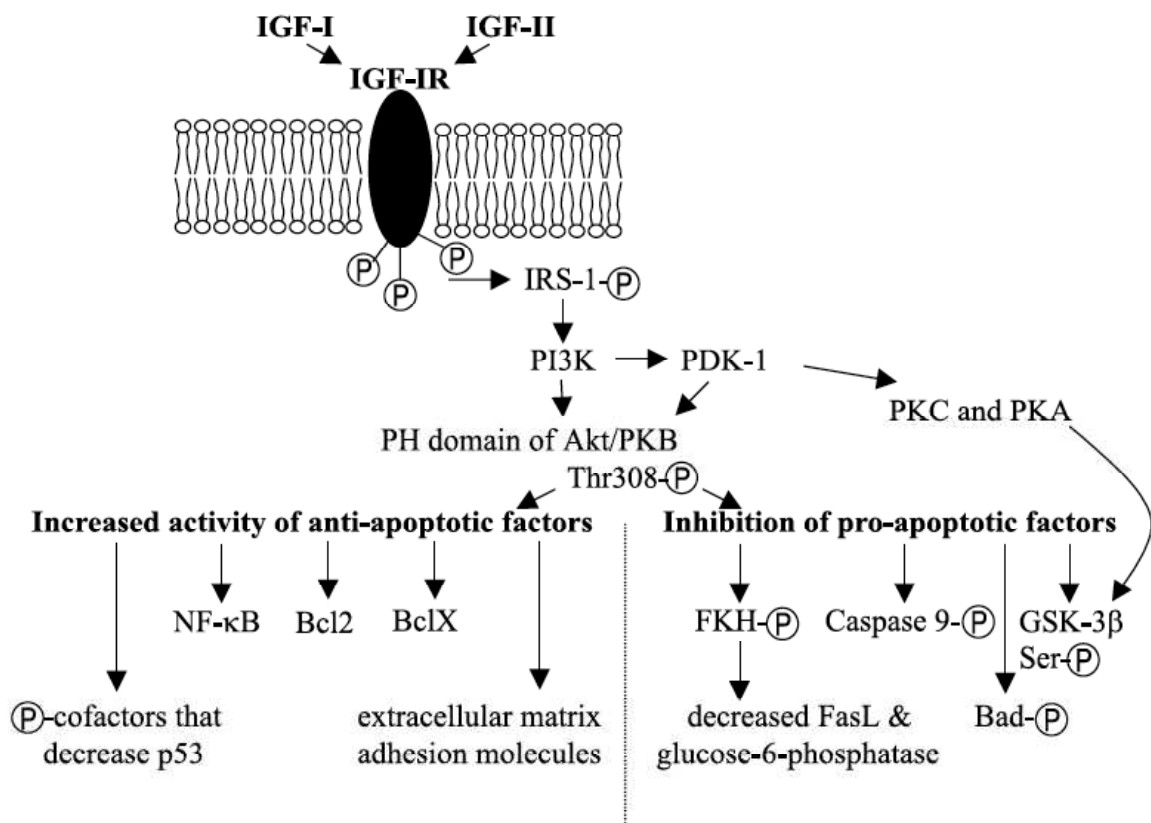


Figura 8: Diagrama de les dianes cel·lulars del Receptor d'IGF-I (IGF-IR) activat, que promou la inhibició de la mort cel·lular programada. L'activació d'IGF-IR i el reclutament i posterior activació de les diferents proteïnes implicades en vies de senyalització, modulen efectors i inhibidors de diferents punts de l'apoptosi cel·lular (Vincent and Feldman, 2002).

3.2. IGF-I a sistema nerviós.

L'expressió d'IGF-I i IGF-II a les cèl·lules de la cresta neural i en zones restringides, determinen la importància d'aquests factors en la migració neuronal, dianes axonals i el manteniment d'aquestes connexions. El creixement de les neurites és un aspecte important pel desenvolupament neuronal, sobretot pel desenvolupament de neurones sensorials i motores. La via de senyalització IGF-I/IGF-IR juga un paper molt important en el desenvolupament del sistema nerviós. En cultius cel·lulars IGF-I activa dues proteïnes d'adhesió FAK (*focal adhesion kinase*) i paxilin, involucrades en extensió de neurites (Leventhal *et al.*, 1997). Aquest procés també s'observa en cultius de DRG, on IGF-I també promou el creixement de neurites (Ozdinler and Macklis, 2006).

IGF-II és el factor majoritari en el desenvolupament del sistema nerviós central, el trobem present a cervell, a estructures vasculars de sistema nerviós i a motoneurones. Per altra banda, IGF-I es localitza majoritàriament a medul·la espinal, a ganglis de l'arrel dorsal, nervi ciàtic i també a cervell. L'àmplia distribució dels IGF i els seus respectius receptors a nervis perifèrics suggereix la importància d'aquest en el manteniment de l'estructura del nervis perifèrics. Tot i els elevats nivell d'expressió d'IGF-I, l'àmplia distribució d'IGF-IR a sistema nerviós i els potents efectes d'IGF-I quant a creixement i distribució de les neurites, la manca d'IGF-I com d'IGF-II en ratolins no suposa un retard en el desenvolupament del sistema nerviós (Liu *et al.*, 1993). Aquest fet pot ser degut a la compensació d'un per l'altre o per la presència d'altres factors neurotròfics, durant el desenvolupament del sistema nerviós (Ye *et al.*, 2002). Fet també observat en ratolins dobles knock-out per IGF-I on s'observen canvis a nivell neurofisiològic amb una disminució de la velocitat de conducció nerviosa, però no hi ha pèrdua de fibres mielíniques quan manquen IGFs (Gao *et al.*, 1999). En canvi quan es delaciona IGF-IR no s'activa la via de senyalització d'IGF-I/IGF-IR i esdevé amb la mort en estadis perinatals (Liu *et al.*, 1993).

D'altra banda IGF-I juga un paper important en el desenvolupament i diferenciació de les SC, actuant com a agent mitògen sobre aquestes cèl·lules durant el desenvolupament. En cultius *in vitro* s'ha observat que IGF-I, IGF-II i insulina promouen l'expressió de la proteïna de la mielina P0, un marcador important de la diferenciació de les SC en SC mielinitzants (Stewart *et al.*, 1996). Quan es produeix lesió a nervi perifèric les SC són una font important d'IGF-I. La síntesi d'IGF-I activa el procés de regeneració axonal i la síntesi de *novo* d'àcid grassos, que són necessaris per la formació de les beines de mielina. També s'ha observat en cocultius de SC i neurones sensorials, que en presència del factor neurotròfic IGF-I augmenta la síntesi d'àcids grassos (Liang *et al.*, 2007).

In vivo IGF-I i IGF-IR predominantment s'expressen a nivell de DRG, preferentment en neurones sensorials de diàmetre petit, ampliant la seva expressió a totes les neurones de DRG quan es produeix lesió (Russell *et al.*, 2000). També se sintetitza IGF-I a neurones motores i a múscul esquelètic. Generalment l'aport tròfic a sistema nerviós perifèric el realitzen molts factors neurotròfics, però IGF-I és el més important i l'únic factor neurotròfic que s'expressa en regeneració de neurones sensorials i motores, on s'estimula la regeneració i la restauració de la lesió (Rabinovsky *et al.*, 2003). A nivell de neurones motores, IGF-I intervé quan es produeix lesió a medul·la espinal, evitant la pèrdua de neurones motores, fet que també s'observa quan la lesió és produïda per axotomia, on manté i, fins i tot, augmenta el nombre d'unions neuromusculars i es manté la morfologia muscular (Figura 9) (Vergani *et al.*, 1998).

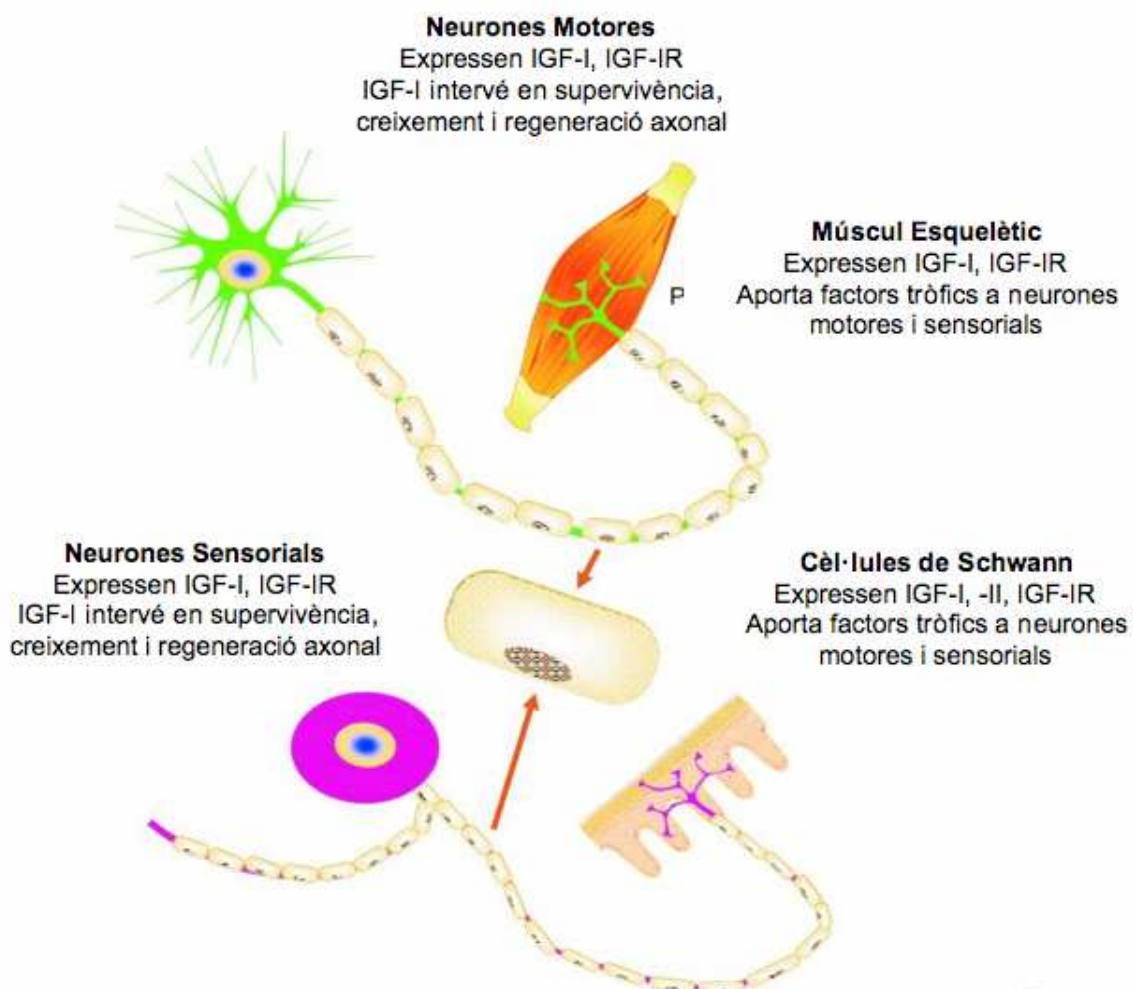


Figura 9: IGFs a sistema nerviós perifèric. IGF-I, IGF-II i IGF-IR tenen un paper important en supervivència, proliferació i diferenciació de neurones sensorials i neurones motores, així com a múscul esquelètic i a cèl·lules de Schwann. Adaptat de (Sullivan *et al.*, 2008).

L'expressió d'IGF-I es correlaciona amb el creixement i regeneració del nervi perifèric després d'una lesió. Es detecta en axons i SC de nervi ciàtic després d'una lesió, on les cèl·lules de Schwann localitzades a la regió distal produeixen concentracions elevades d'IGF-I. Sembla que actuaria a nivell proximal estimulant la regeneració axonal, tot i que no se sap si l'acumulació d'IGF-I al lloc de la lesió és deguda a una alteració del transport axonal o a un efecte terapèutic local, generat com a resposta a la lesió.

En diabetis s'observa alteració de la síntesi i nivells d'expressió de factors de creixement a sistema nerviós perifèric. Aquest fet pot debilitar la capacitat de les neurones i les SC de regenerar. En diabetis tipus I, l'alteració de les vies de senyalització d'IGF-I, insulina i pèptid C, podrien contribuir en el desenvolupament i progressió de la degeneració axonal i, també empitjorarien la capacitat regenerativa del SNP. L'alteració del sistema IGF-I és menys pronunciat en DM tipus II, on les complicacions neurològiques són menys freqüents. Gràcies a la capacitat anti-apoptòtica d'IGF-I, i la capacitat de regular l'expressió de gens mielinitzants i de components del citoesquelet axonal, es considera un factor de creixement important pel tractament de les complicacions neurològiques associades a diabetis (Figura 9) (Toth *et al.*, 2006).

IGF-I exerceix el seu efecte neurotròfic a fibres nervioses sensorials, motores i autònomes, efectes similars també descrits per insulina i pèptid C (Pierson *et al.*, 2003). En rates diabètiques BB s'observa una disminució gradual dels nivells d'expressió d'IGF-I sis setmanes després de la inducció de la diabetis tipus I (Xu and Sima, 2001), tot i així les alteracions en l'activitat d'IGF-I a SNP són diferents a les de SNC, doncs s'observen més ràpidament alteracions neurològiques a perifèric que a central (Li *et al.*, 2002).

4. TERÀPIA GÈNICA

La teràpia gènica és una de les disciplines de la biomedicina que ha permès desenvolupar tècniques i protocols amb potencial terapèutic, per tractar tant malalties d'origen genètic com adquirides. La teràpia gènica consisteix en la introducció d'àcid nucleic forani (DNA i RNA) amb la finalitat de corregir o alleujar els símptomes d'una malaltia. En general, el tractament per teràpia gènica de la majoria de malalties cròniques requereix l'expressió d'un gen terapèutic durant tota la vida del pacient, per això el desenvolupament de vectors terapèutics segurs, que permetin l'expressió del transgen a llarg plaç o durant llargs períodes de temps i que eviti una resposta immunitària del pacients, és imprescindible perquè aquests vectors puguin ser utilitzats en protocols de teràpia gènica *in vivo*.

La teràpia gènica presenta tres components indissociables i necessaris; **1)** Un gen d'interès del qual s'espera que la seva expressió en una cèl·lula normal s'acompanyi d'un efecte terapèutic, **2)** La cèl·lula diana sobre la qual es realitza la modificació, **3)** El vector, vehicle que transporta el material genètic i permet la seva introducció a la cèl·lula diana.

4.1. Teràpia gènica viral

Els vectors virals han esdevingut eines atractives per la teràpia gènica, doncs compleixen els requisits necessaris de manera que es pot controlar la seva infectivitat *in vivo*, dins la cèl·lula hoste, inhibint la seva capacitat replicativa però permetent introduir material genètic, contingut a la partícula viral i que aquest es mantingui dins la cèl·lula infectada.

Dins dels diferents vectors virals existents els més utilitzats són els retrovirus murins (MLV), els Adenovirus (Ad), els virus adeno-associats (AAV), els lentivirus (HIV) i els herpes virus (HSV). Actualment la majoria d'assajos clínics que es duen a terme es fan mitjançant vectors adenovirals, però una resposta immunitària forta contra aquest vectors dificulta la seva utilització en assajos de teràpia gènica a llarg termini (Figura 10).

Els vectors Adenovirals generen uns nivells d'expressió del transgen elevats, característica important per un bon vector per teràpia gènica, però aquesta expressió generalment es transitòria i a més genera una forta resposta immunològica. En humans els Ad s'han utilitzat sobretot com vacunes i en tractaments anti-tumorals, on la resposta immunològica suposa una avantatge en el tractament de la malaltia.

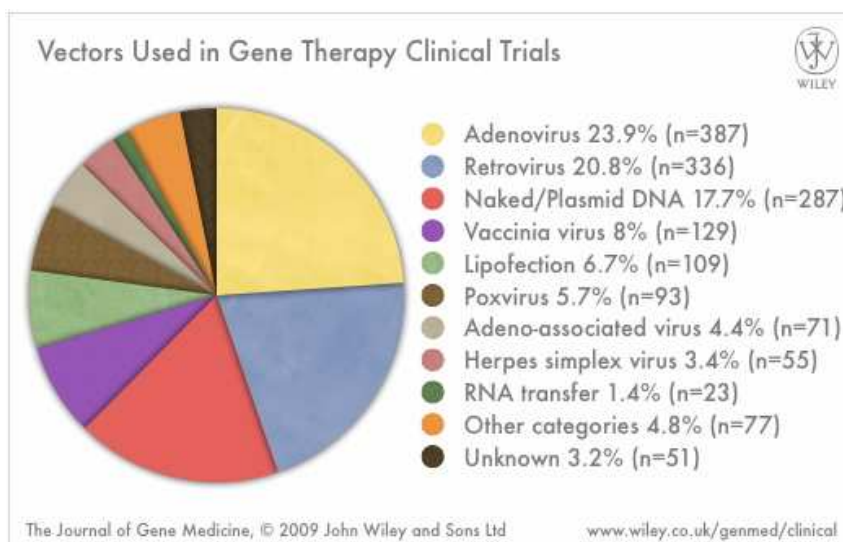


Figura 10: Esquema representatiu dels vectors de teràpia gènica utilitzats actualment en assajos de teràpia gènica en humans. (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>)

Els HSV wt (salvatge) presenten un tropisme natural pel sistema nerviós, on són capaços d'establir una infecció persistent, mantenint-se dins la cèl·lula hoste en estat latent, com a elements episomals intranuclears, al llarg de la vida útil de la cèl·lula hoste. Els virus wt es transmeten per contacte directe, replicant-se inicialment en cèl·lules epitelials de la pell o de la mucosa, generen virions que tenen la capacitat de retrotransportar-se a través dels axons de les neurones fins al soma, on s'activa el cicle lític dels virus provocant dany cel·lular. Els vectors recombinants HSV, se'ls elimina la capacitat d'iniciar el cicle lític i es mantenen en estat latent persistent a la cèl·lula hoste.

Els vectors derivats d'herpes simple (HSV) s'han utilitzat de manera eficient al SNP. Són virus exclusius de neurones sensorials i es distribueixen pel sistema nerviós mitjançant transport retrògrad axonal (Chattopadhyay *et al.*, 2005b). Tanmateix el genoma dels vectors HSV contenen encara gran quantitat de gens silvestres, pel que podrien donar problemes de bioseguretat en assajos clínics. L'expressió a llarg plaç de gens terapèutics dirigits per HSV necessiten de promotors de gens latents d'aquests virus, que no obstant donen una expressió baixa (Fink *et al.*, 2000).

Els vectors AAV són interessants com a vectors terapèutics, ja que no causen cap patogènia en humans, i sembla que els vectors recombinants es mantenen en forma de DNA d'elevat pes molecular dins la cèl·lula hoste, fet que permet l'expressió del transgen durant llargs períodes de temps (McCarty *et al.*, 2004). Són menys immunogènics que els Ads i a diferència dels HSV no contenen cap gen viral, per tant augmenta el seu nivell de bioseguretat.

4.2. Actualitat de la teràpia gènica

L'èxit de la teràpia gènica en assajos clínics en humans depèn del desenvolupament de vectors que garanteixin l'expressió del transgen sense efectes secundaris. Actualment no existeix cap vector ideal que permeti la seva aplicació pel tractament de les malalties genètiques. Per això cada vector està específicament dissenyat per tractar una malaltia determinada. En els últims anys s'han realitzat diferents assajos clínics en fase I, II i III, amb diferents vectors virals, amb resultats variables.

S'han observat resultats esperançadors en dos assajos clínics en Fase III, per la malaltia de la immunodeficiència severa combinada (SCID-X1), utilitzant vectors retrovirals. Tanmateix, en estudis posteriors es va veure que la integració del transgen al genoma cel·lular es produïa pròxima a un protooncogen (LMO2), fet que va provocar el desenvolupament de leucèmia en quatre dels pacients tractats (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Per aquest motiu, l'estudi de vectors amb baix índex d'integració ha adquirit una rellevància considerable.

La capacitat no integrativa dels vectors rAAV i el tropisme preferencial per cèl·lules en estat quiescent, permet utilitzar aquests vectors principalment pel tractament de malalties que tenen afectació a sistema nerviós, muscular i malalties oculars, teixits on s'ha observat una elevada eficiència d'infecció per AAVs recombinants (rAAVs). A més els AAV tenen la capacitat d'expressar-se durant llargs períodes de temps dins la cèl·lula hoste, evitant readministracions continuades del vector viral.

És de destacar l'assaig en fase III amb rAAV2 codificant per RPE65 pel tractament de la ceguesa infantil congènita, anomenada amaurosis congènita de Leber, que ha obtingut resultats importants quant a la millora de la capacitat visual del pacients i no s'han observat efectes secundaris adversos. Els resultats obtinguts quant a l'extensió de la retina i la magnitud de cons i bastons (components de la sensibilitat visual de la retina) es manté als mateixos nivells fins a 3 i 12 mesos després de l'administració del vector terapèutic (Cideciyan *et al.*, 2009).

4.3. Vectors Adeno-associats

Els virus adeno-associats són membres de la família Parvoviridae, provenen del gènere Dependovirus, i requereixen un virus "helper", com adenovirus o herpes simplex virus, per facilitar la proliferació i replicació dels virions.

Els adeno-associats silvestres (wt) s'integren al genoma de la cèl·lula diana i, en absència del *helper*, estableixen una infecció latent. El lloc d'integració al genoma de la cèl·lula hoste és específic, s'integra en una regió al cromosoma 19 humà (19q 13-qter) amb elevada freqüència. A

diferència dels virus adeno-associats (wt), els vectors recombinants no s'integren al genoma de la cèl·lula diana, degut a la manca del gen *Rep* (codifica per replicació).

Els virus adeno-associats tenen la capacitat d'infectar tant cèl·lules en divisió com cèl·lules quiescents o diferenciades, aquest fet fa que s'utilitzin àmpliament com a vectors virals.

El viriò té un diàmetre entre 18 i 26 nm i un pes molecular de 5.5-6.2 MDa. El genoma viral està format per una cadena senzilla de DNA de 4,7 kb, en la qual, als extrems 5' i 3' trobem els ITRs (*Inverted Terminal Repeats*), seqüències riques en nucleòtids GC (Guanina, citosina) i, que poden formar estructures palindròmiques. Aquestes ITRs flanquegen dues pautes obertes de lectura, que codifiquen pels gens *Rep* i *Cap*, i que equivalen al 90% del genoma viral.

Els ITRs d'ambdós extrems presenten tres funcions principals; 1) l'extrem 3' serveix d'encebador per la síntesi de la nova cadena de DNA, 2) és el lloc d'unió per les proteïnes Rep78 i Rep68 (RBS, *Rep binding site*), on s'inicia la funció d'helicases i endonucleasas, 3) contenen TRS (*terminal resolution site*), seqüència idèntica a una regió del cromosoma 19, que té la funció de seqüència d'integració del genoma viral (Figura 11).

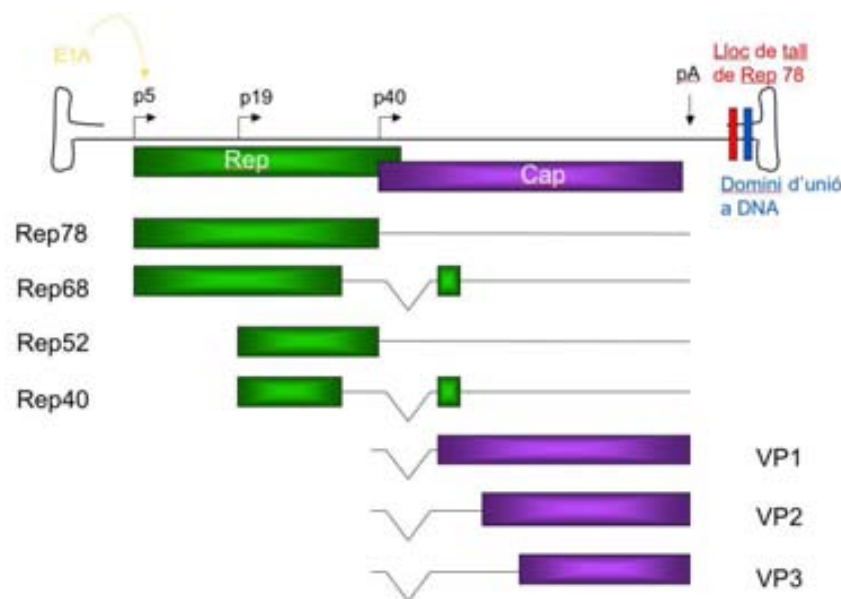


Figura 11: Genoma dels virus adeno-associats

El gen *Rep* codifica per quatre proteïnes (*Rep78*, *Rep68*, *Rep52* i *Rep40*) que tenen un paper important en molts passos del cicle vital del viriò i es transcriuen a partir de dos promotors, p5 i p19. El promotor p5 activa la transcripció de les proteïnes Rep78 i Rep68, de les qual aquesta última presenta variants d'esplicing alternatiu. Són proteïnes essencials per la replicació del DNA viral, pel control de la transcripció i del lloc d'integració. La transcripció de

les proteïnes Rep52 i Rep40 s'activa pel promotor p19 i tenen la funció d'agrupar cadenes senzilles del genoma perquè posteriorment siguin encapsidades.

El gen *Cap* codifica per tres proteïnes de la càpside viral; VP1, VP2 i VP3, que es transcriuen a partir del promotor p40. Formen les 60 subunitats de la càpside viral amb una proporció 1:1:20 respectivament, i la càpside presenta una simetria icosaèdrica (Lu, 2004).

Quan els virus adeno-associats s'utilitzen com a vectors, els gens *Rep* i *Cap* són substituïts pel transgen i les seves seqüències reguladores. Durant la producció viral, els gens *Rep* i *Cap* són subministrats en trans, juntament amb gens d'adenovirus o herpes simplex virus. La llargada total de l'insert no pot excedir de 4,7 kb, que equival a la llargada del genoma wt (Srivastava *et al.*, 1983). Per tant, com a vectors de teràpia gènica tenen limitació de talla. Degut a la simplicitat de la càpside viral i a la manca del genoma viral, són menys immunogènics que els Ads, tot i que, es poden trobar anticossos neutralitzants contra la càpside viral, no s'observa patogènia, i a més, a nivell de teixit específic, la readministració del virus no està limitada en cas de ser necessari, però sí que s'observa una disminució de l'activitat del transgen (De Wit *et al.*, 2006).

4.3.1. Adeno-associats de cadena complementària (AAVsc)

Tot i l'efectivitat dels AAVs com a vectors de teràpia gènica, el genoma d'aquests presenta un pas limitant en el procés d'infecció de la cèl·lula diana. El fet que siguin virus amb un genoma format per una cadena senzilla de DNA (ssDNA), fa que quan aquests vectors entren a la cèl·lula, requereixen d'un pas previ on es sintetitza la cadena complementària del genoma viral (dsDNA). Aquest punt limita en un principi l'efectivitat dels AAV ssDNA, perquè necessiten de mecanismes de transcripció cel·lular per sintetitzar la cadena complementària del DNA i, al mateix temps facilita l'acció de DNAses que eliminen DNA viral de dins la cèl·lula hoste (Ferrari *et al.*, 1996).

Una variant de vectors adeno-associats (ssAAV) anomenada self-complementary AAV (scAAV). El DNA d'aquests vectors, a diferència dels ssAAV s'encapsida en forma de dímer o DNA de doble cadena. La capacitat d'encapsidar-se en DNA de doble cadena augmenta l'efectivitat d'infecció, degut a que aquests vectors no han de sintetitzar la cadena complementària del DNA i, així eviten l'acció de mecanismes cel·lulars tant per la síntesi de la cadena complementària com per l'eliminació del DNA forani dins la cèl·lula, accelerant el procés d'infecció i passant directament a la replicació del genoma viral (McCarty *et al.*, 2003).

Els scAAV es caracteritzen per un augment de l'expressió del transgen que contenen, i una expressió més ràpida del transgen, però al mateix temps la capacitat del genoma viral scAAV es veu disminuïda a la meitat a 2,35Kb, respecte a la capacitat que tenen els ssAAV de 4,7Kb (Figura 12).

Per la generació dels vectors de cadena complementària (sc) es parteix d'un genoma viral de DNAss on un dels dos ITR presenta una delació en part de la seva seqüència. Aquesta delació fa que s'inhibeixi l'inici de replicació en aquest ITR mutat. La replicació del genoma viral comença en el ITR 3' wt i continua fins a arribar al ITR mutat on no s'atura la replicació. El fet que els ITR són seqüències repetitives/ palindròmiques, fa que, en aquest ITR mutat es formi un bucle i es continuï la replicació del DNA formant una seqüència complementària invertida. Finalment el genoma viral obtingut conté dos ITR 3' i 5' wt i un ITR mutat al mig del genoma viral.

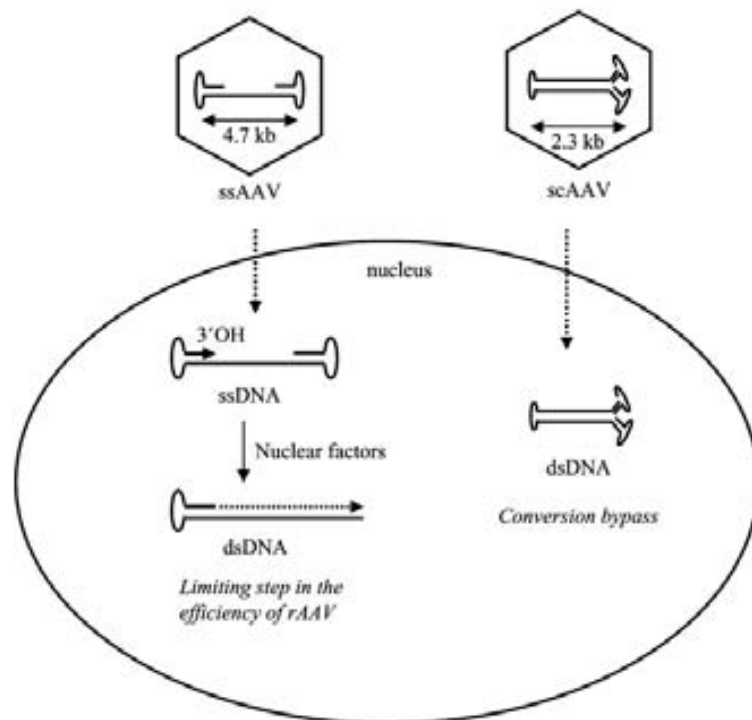


Figura 12: Esquema representatiu de les diferències del genoma dels ssAAV i sc AAV, extret de (Duque *et al.*, 2009).

4.3.2. Serotips de virus Adeno-associats.

Inicialment es definia un nou serotip d'AAV si aquest no reaccionava o no s'inhibia en presència de sèrums neutralitzats, contenint anticossos específics contra altres serotips ja caracteritzats (Erles *et al.*, 1999).

Seguint aquest sistema de caracterització dels serotips es van identificar sis AAVs diferents. Els serotips de l'1 al 6 es van aïllar de solucions estoc d'adenovirus (Schmidt *et al.*, 2006), amb l'excepció de l'AAV5 que es va aïllar de teixit humà (berrugues) (Bantel-Schaal and zur Hausen, 1984). D'aquests 6 serotips, se'ls atribueix un origen humà als serotips AAV 2, 3 i 5, degut a la presència d'anticossos neutralitzants en gran part de la població, en canvi AAV4 es va aïllar de primats no humans.

Amb el temps es van anar definint nous serotips d'AAV, entre ells els serotips 7, 8, 9 i fins a unes 100 variants, partint de seqüències aïllades de DNA de teixits humans i de teixits de primat no humans, amplificant-los per PCR (Gao *et al.*, 2002).

4.3.2.1. Clades

S'han realitzat estudis per caracteritzar les propietats estructurals, serològiques i funcionals dels diferents serotips AAV, que han permès un nou sistema de classificació d'AAVs mitjançant *Clades*.

Partint de mostres de diferents teixits tant humans com de diferents primats no humans, s'han identificat uns 108 serotips d'AAVs, d'aquests uns 55 són d'origen humà i 53 provenen de primats no humans. Mitjançant PCR, s'han quantificat i seqüenciat les regions del genoma dels AAV que codifiquen per les proteïnes de la càpside *Cap*. Entre les diferents seqüències obtingudes, la major variabilitat entre serotips d'AAV s'observa a les regions més externes de la càpside (Govindasamy *et al.*, 2006). Aquestes regions comprenen entre un 18 i un 19% de l'estructura de la càpside viral, on petites variacions a nivell de la càpside poden esdevenir en canvis estructurals i funcionals del vector viral. Les seqüències *Cap* obtingudes han estat sotmeses a anàlisis computacionals i on s'han relacionat entre elles mitjançant estudis de filogènia, que han permès classificar els diferents serotips en 11 grups filogenètics. Quan un grup conté membres no redundants provinents de tres o més fonts diferents, però filogenèticament semblants, s'anomenen *Clades* (clons o grup de clons). Els *Clades* es classifiquen en sis grups des del grup A al grup F, dividits en 2 grups monofilics, un grup que comprèn els *Clades* A, B i C, que són d'origen humà, i un segon grups que comprèn el D també d'origen humà. L'E que prové de primats no humans i el *Calde* F presenta AAVs d'ambdós orígens (Figura 13) (Gao *et al.*, 2004).

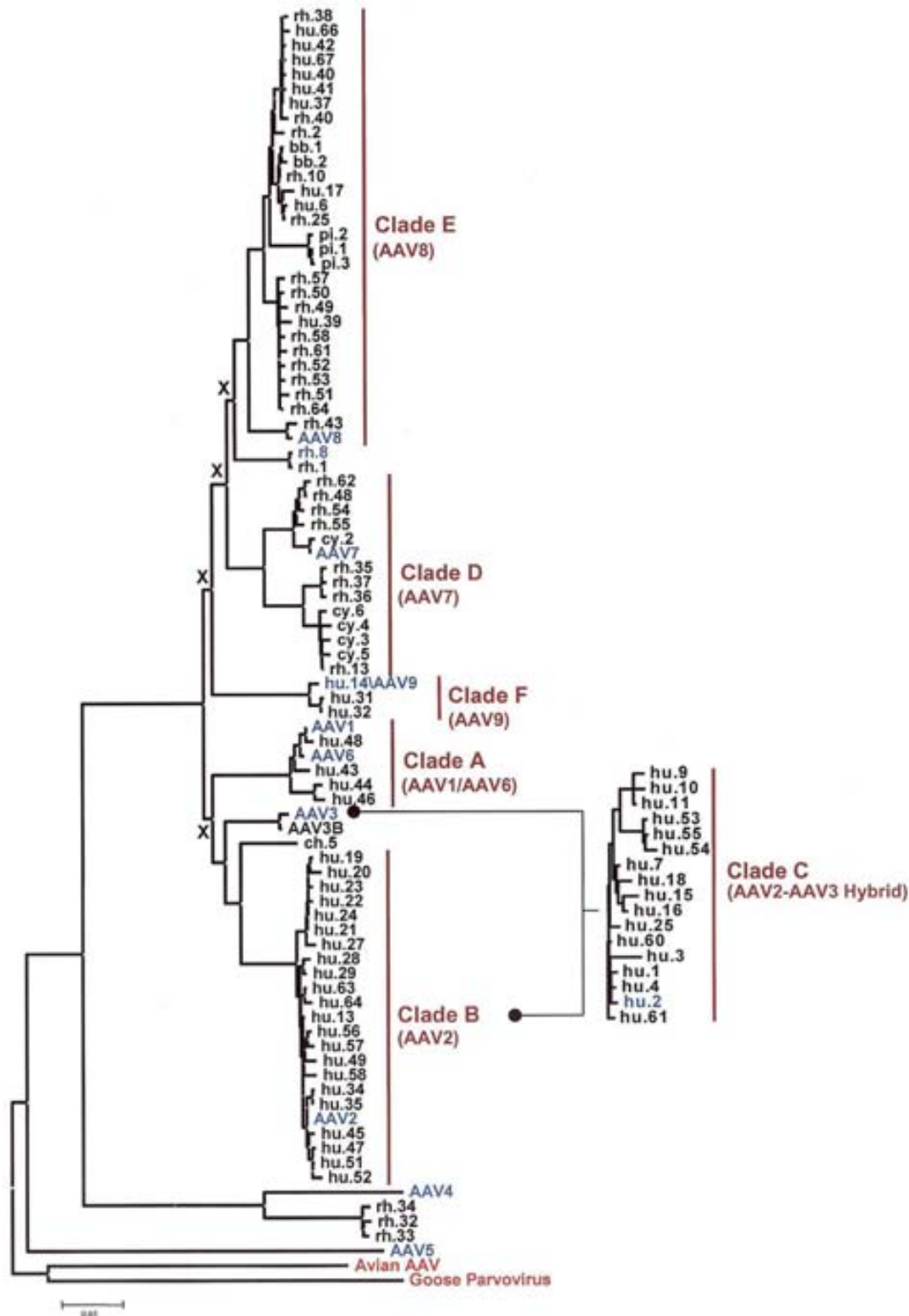


Figura 13: Organigrama de les relacions filogenètiques dels diferents serotips de virus Adeno-Associats, relacionats entre ells en funció de l'homologia de la seqüència de la proteïna de la càpsida VP1. La nomenclatura utilitzada per descriure per cada serotip fa referència a la font de la qual procedeix: hu. Humà, rh, resus macaque, cy, cynomalgus macaque; bb, baboon; pi, pigtailed macaque; ch, chimpanzee. El número que el precedeix equival a l'ordre de seqüenciació dels diferents serotips. Finalment s'agrupen els serotips en *Clades* en funció de l'homologia de seqüència *Cap* (Gao *et al.*, 2004).

4.3.3. Tropisme dels virus Adeno-associats

Els virus Adeno-associats entren a la cèl·lula hoste mitjançant receptors de membrana. Cada serotip d'AAV presenta una estructura de la càpside específica. La unió entre la càpside del virus i la cèl·lula hoste es produeix mitjançant receptors específics, fet que fa que cada serotip pugui presentar un tropisme particular pels diferents tipus cel·lulars.

Tot i l'especificitat pel receptor que presenten els serotips d'AAV, el tropisme pot variar en funció de la via d'administració utilitzada.

Dels diferents serotips d'AAV descrits fins a l'inici d'aquesta tesi, el més estudiat és l'AAV2, té la capacitat de transduir diversos teixits quan és administrat *in vivo*, infecta teixits com múscul esquelètic transduïnt específicament fibres musculars (Fisher *et al.*, 1997), múscul cardíac (Vassalli *et al.*, 2003), fetge (Xiao *et al.*, 1998a) i cervell (Xiao *et al.*, 1997) on transdueix específicament neurones i no astròcits o microglia, quan s'injecta a l'hipocamp (Bartlett *et al.*, 1998).

Tot i l'eficiència mostrada per el AAV2, quan es va estudiar el tropisme d'altres serotips d'AAVs es van observar els nivells de transducció més elevats que per AAV2, i a més un augment de l'especificitat de teixit transduït. Així, quan s'administren localment a pulmó, *in vivo*, els serotips de l'1 al 9, AAV6 es el que presenta un tropisme més específic per pulmó, transduïnt un 50% més de cèl·lules del conducte aeri i epiteli alveolar que AAV1 i AAV5, aquests infecten un 30% més que la resta de serotips testats (Halbert *et al.*, 2007; Limberis *et al.*, 2009). La transducció a pàncrees s'aconsegueix principalment amb AAV8, que comparat amb AAV2 presenta uns nivells d'expressió deu vegades els aconseguits amb AAV2, obtenint expressió elevada del transgen a setmana 1 post-injecció i es manté fins a setmana 8. En canvi, AAV2 presenta un pic d'expressió a setmana 4 però aquests nivells disminueixen fins un 90% a setmana 8 (Loiler *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). En estudis anteriors, s'ha observat que AAV2 és capaç de transduir l'endoteli vascular, però a nivells baixos. En estudis realitzats per Chen *et al.*, 2005, troben que AAV1 i AAV5 transdueixen eficientment l'endoteli vascular, *ex vivo* i *in vivo*, 3 setmanes després de l'administració del vector. Principalment observen cèl·lules endotelials transduïdes amb AAV5, el doble de cèl·lules que per AAV1 a una concentració de vector de $1 \cdot 10^{13}$ vg/ml (Chen *et al.*, 2005). Tot i el tropisme muscular mostrat per AAV2, quan s'han administrat altres vectors a múscul esquelètic s'ha observat que AAV1 sobretot, i també AAV6, transdueixen múscul millor que AAV2. L'eficiència de la transducció d'AAVs a múscul varia en funció dels vg injectats, tot i així comparant AAV1, 2 i 5 injectats a múscul a les mateixes dosis AAV1 presenta uns nivells de transducció més elevats, unes 5 vegades superior a AAV5 i 12 vegades a AAV2. Comparant AAV2 i AAV6 a múscul, s'observa una transducció de

múscul 50 vegades superior per AAV6 comparant amb AAV2, tot i que amb el temps els nivells d'expressió dels dos vectors s'igualen (Blankinship *et al.*, 2004; Riviere *et al.*, 2006). Quan s'administra directament a cor els serotips 1, 6 i 8, presenten un tropisme més específic. A setmana 1 post-injecció amb AAV8 s'observen nivells de transducció d'un 40% més elevats respecte als serotips 1, 6 i 7 i gairebé un 80% respecte AAV4 i 5. En canvi, a les mateixes condicions els nivells d'expressió d'AAV2 i 3 són indetectables (Palomeque *et al.*, 2007).

Quan s'administren directament a ull els diferents serotips d'AAV, el tropisme d'aquests varia depenen del lloc d'injecció del vector. Quan AAV1, 2, 5, 7 i 8 són administrats a la còrnia AAV1 presenta una major eficiència de transducció comparant amb els altres vectors, una eficiència del 17% superior a AAV8, i un 35% superior a AAV2 i 7, en canvi AAV5 mostra els nivells més baixos de transducció a còrnia. Tot i així AAV2 s'ha mostrat com un bon vector de teràpia gènica per a ulls, sobretot quan s'injecta a retina, on transdueix cèl·lules fotoreceptores (Lotery *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008).

S'han testat els serotips de l'1 al 9 administrats via sistèmica. Els serotips 1, 6, 7, 8 i 9 presenten uns nivells d'expressió més elevats que els AAV 2, 3, 4 i 5, que s'expressen menys eficientment en diferents teixits. Per aquest sistema d'administració la majoria dels virus es queden retinguts a fetge, però també es veu transducció a múscul esquelètic i el cor. A fetge el serotip més eficient és AAV9 seguit dels AAV 8, 7, 6 i 1, i menys eficientment els serotips AAV 5 i 2. A múscul esquelètic només s'observa transducció pels AAV 1, 6 i 9, en canvi el cor es transdueix preferentment per AAV9, seguit d'AAV4, 8 i 6 (Wang *et al.*, 2005a; Zincarelli *et al.*, 2008; Paneda *et al.*, 2009). S'ha observat que AAV9 presenta característiques particulars quan és administrat via sistèmica. Aquest serotip infecta cèl·lules neuronals i cèl·lules gials a sistema nerviós central quan s'injecta a ratolins nous, en canvi, en ratolins adults només infecta cèl·lules gials (Foust *et al.*, 2009). Els autors de l'estudi suggereixen que AAV9 és l'únic serotip que té la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica en animals adults i transduir astròcits via receptors específics presents en cèl·lules endotelials, ja que els peus astrocitaris perivasculars estan en contacte amb les cèl·lules endotelials per mantenir aïllat el líquid cefaloraquídi de la circulació general.

El virus recombinant rAAV2 s'ha utilitzat extensament com a vector de transferència gènica a sistema nerviós, sobretot a sistema nerviós central, però la caracterització de nous serotips recombinants ha permès millorar l'eficiència de transducció dels AAV a diferents regions del cervell i medul·la espinal.

En diferents estudis de tropisme amb rAAV2, aquest mostra una elevada eficiència de transducció a neurones de les diferents estructures cerebrals, com a substància nigra, àrea septal i a globus pallidus, però no és tan eficient a estriat (Tenenbaum *et al.*, 2000). Comparant rAAV2 amb altres serotips com rAAV1 i rAAV5, quan s'administren en regions concretes del cervell s'observa variació en l'eficiència de transducció dels diferents rAAV (Passini *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005), rAAV1 i rAAV5 també tenen tropisme específic per neurones quan s'injecten a parènquima cerebral, i a més tenen la capacitat de difondre a altres regions del cervell, regions distals del lloc d'injecció, propietat no observada amb rAAV2 (Burger *et al.*, 2004; Taymans *et al.*, 2007).

A sistema nerviós central s'han testat varis serotips recombinants: rAAV1 - 9, rh10, rh43. S'ha observat que AAV4 presenta especificitat per cèl·lules endotelials dels ventricles cerebrals (Davidson *et al.*, 2000). En regions com el nucli estriat, hipocamp (regió hiliar i neurones piramidals), globus pallidus, substància nigra, cerebel i medulla espinal, rAAV1 i 5 presenten una elevada transducció (Klugmann *et al.*, 2005).

Correlacionant amb l'elevada eficiència de transducció de neurones mitjançant rAAV1 en rosegadors, recentment s'ha observat que quan aquest vector s'administra a sistema nerviós central de primats no humans, també es transdueixen cèl·lules neurogials com oligodendròcits i astròcits (Hadaczek *et al.*, 2009). En estudis posteriors realitzats per Markakis *et al.*, on injecten a cervell de primats els serotips de l'1 al 6, observen que el serotip més eficient és AAV5, que transdueix tant neurones (substància nigra i estriat) com astròcits (Markakis *et al.*, 2010). En estudis realitzats amb altres serotips recombinants com rAAV7, 8, 9 i rh10 quan s'injecten a regions específiques de SNC unilateralment, es transdueixen específicament neurones a escorça cerebral, estriat, hipocamp i tàlam. AAVrh10 presenta un millor eficiència de transducció en la regió del tàlam transduïnt un 40% més de neurones que AAV9 i gairebé un 90% més que AAV8, en canvi rAAV 7 i 9 són més eficients a escorça cerebral, amb uns nivells de transducció aproximadament del 60% superior a AAVrh10 i AAV8, únicament a la regió de l'estriat els diferents vectors presenten uns nivells de transducció semblants. Tot i que aquests vectors s'injecten en regions específiques del cervell, s'ha observat que tenen la capacitat de difondre del lloc d'injecció, transduïnt estructures cerebrals allunyades del lloc d'injecció. Entre els diferents vectors testats, rAAV9 presenta una major capacitat de difusió del lloc d'injecció, seguit d'AAVrh10 a proporcions pràcticament iguals a AAV9 (Cearley and Wolfe, 2006).

4.4. Teràpia gènica per neuropatia diabètica

La majoria dels factors neurotròfics s'expressen en nivells elevats durant el desenvolupament, i s'expressen també en condicions de mort cel·lular programada, en períodes crítics del desenvolupament.

En adults els factors neurotròfics intervenen en processos de protecció neuronal davant d'agents tòxics, i ajuden a la ràpida i correcta regeneració quan es produeix una lesió nerviosa.

Els factors neurotròfics es diferencien entre ells per la seva distribució *in vivo*, per la distribució dels seus receptors a nivell tissular i cel·lular, i sobretot pel mecanisme d'acció que duen a terme quan s'uneixen a receptor. La resposta de neurones adultes a aquests receptors proporciona un potencial terapèutic important per pal·liar els efectes de la lesió cel·lular o de la neurodegeneració.

En models animals de neuropatia diabètica s'ha observat que la utilització de factors neurotròfics presenten un efecte protector contra el desenvolupament i la progressió de la neuropatia, però la inestabilitat dels factors neurotròfics, degut a una vida mitja curta, limita l'efectivitat d'aquests pèptids quan la seva utilització es trasllada a humans.

NGF és un dels factors neurotròfics més estudiats com a teràpia per neuropatia diabètica. L'expressió de NGF se centra principalment en neurones sensorials petites peptidèrgiques (Unger *et al.*, 1998). En condicions de diabetis, l'expressió de NGF es veu alterada, i al mateix temps es veuen afectats els nivells de CGRP i substància P. Aquest fet provoca una disminució de la velocitat de conducció nerviosa sensorial (SNCV) a nervis perifèrics. Quan s'administra per via subcutània NGF a ratolins diabètics, s'observa un augment del CNAP (Potencial d'acció compost a nervi) del 30% respecte els ratolins diabètics no tractats i no s'observen diferències amb els controls, tot i així el tractament amb NGF subcutani no millora ni MNCV (Velocitat de conducció nerviosa motora) ni SNCV (Elias *et al.*, 1998). Tot i el resultat esperançador obtinguts amb NGF quan és administrat a models murins per neuropatia diabètica, quan aquest factor és administrat a humans, no s'observen efectes positius (Apfel *et al.*, 2000).

Contrari a NGF, el factor neurotròfic GDNF actua principalment en neurones sensorials petites no peptidèrgiques. En rates diabètiques s'observa una disminució de fibres sensorials, que degeneren fins i tot quan s'administra insulina per controlar els nivells de glucosa en sang. En canvi, quan s'administren els dos factors via intratecal en rates diabètiques, s'observa una recuperació de les fibres sensorials petites d'un 15%, comparant diabètics tractats amb no tractats, però els nivells de recuperació aconseguits es mantenen gairebé un 30% més baixos que els controls (Akkina *et al.*, 2001).

Els factors neurotròfics entren a medul·la espinal mitjançant transport anterògrad des de les neurones sensorials de DRG. L'alteració d'aquest transport pot comprometre la supervivència neuronal, activant diferents factors pro apoptòtics. En estudis realitzats per Jongen et al., han vist que administrant intratecalment els factors GDNF i BDNF, augmenta l'expressió de gens primerencs implicats en supervivència cel·lular com són c-Jun i c-Fos (Jongen *et al.*, 2005). Tot i que BDNF promou la supervivència cel·lular, en estudis realitzats en humans, quan s'administra BDNF subcutani en pacients diabètics, no s'observa millora dels diferents paràmetres electrofisiològics analitzats (tests de SNCV i tests de nocicepció a temperatura, etc), i a més els pacients tractats presentaven efectes secundaris com un augment de la motilitat intestinal (Isner *et al.*, 2001).

La neuropatia diabètica principalment afecta a nervis, però a més d'alterar el funcionament neuronal també es veuen afectades altres estructures que formen el nervi, entre elles la pèrdua del sistema circulatori que irriga els nervis. VEGF és un factor de creixement angiogènic que estimula el creixement de vasos sanguinis. Aquest factor s'ha utilitzat també com a teràpia per neuropatia diabètica, ja que es considera que l'alteració del vasa nervorum és un dels primers passos que es produeixen en nervis diabètics. Quan s'administra un plàsmid que codifica per VEGF, mitjançant injecció intramuscular en pacients diabètics amb isquèmia vascular de les extremitats inferiors, no es van observar canvis positius en la irrigació de les zones afectades, contràriament al que s'havia observat en ratolins (Kusumanto *et al.*, 2006).

De la família de factors neurotròfics IGFs destacaríem la insulina i IGF-I, com a factors més prometedors pel tractament de la neuropatia diabètica. En estudis realitzats per Pierson et al. (Pierson *et al.*, 2003), on administren pèptid C a rates diabètiques, van observar que tant a nervi ciàtic com a DRG es normalitzaven els nivells d'expressió de gens com IGF-I i c-Fos, i fins i tot es recuperava parcialment el transport de factors neurotròfics. Resultats molt semblants es van obtenir en rates diabètiques amb administració subcutània del pèptid C (Kamiya *et al.*, 2006).

Quan s'administra insulina via intranasal a ratolins diabètics, s'observa un increment de la concentració d'insulina a nivell de la medul·la espinal, i en conseqüència un augment de l'activació de les vies de senyalització PI3K/Akt. Els paràmetres electrofisiològics que es troben alterats en diabetis tipus 1, mitjançant insulina intranasal s'observa una millora recuperació de la velocitat de conducció nerviosa sensorial del 10% respecte als animals injectats amb insulina subcutània, però els nivells de recuperació aconseguits es mantenen molt per sota les velocitats de conducció nerviosa obtingudes pels controls (Francis *et al.*, 2009).

Contràriament a la insulina, quan s'administra IGF-I recombinant, aquest té la capacitat de recuperar parcialment els efectes d'hiperalgèsia produïts per la diabetis, però evidentment no

disminueix els nivells de glucosa en sang ni evita la pèrdua de pes deguda a la diabetis. Si s'administra via subcutània IGF-I i IGF-II a rates diabètiques, dues setmanes després del tractament s'observava una millora del 20% en la sensació de dolor (estat d'hiperalgèsia) en rates diabètiques tractades tant amb IGF-I com IGF-II (Zhuang *et al.*, 1996).

L'administració de factors neurotròfics pel tractament de la neuropatia diabètica, mitjançant teràpia gènica no viral, permet observar un efecte terapèutic, però la vida mitja curta dels factors neurotròfics i la limitació de la dosi, fa que l'efecte terapèutic sigui baix. Degut a aquestes limitacions, l'interès pel potencial terapèutic de la teràpia gènica viral ha anat creixent. La teràpia gènica viral és una estratègia terapèutica prometedora ja que ens permet evitar aquestes limitacions i ens permet aconseguir una expressió continuada del pèptid terapèutic.

Dels diferents vectors virals existents, els més prometedors per neuropatia són els HSV i els AAV, tot i que també s'ha utilitzat els Adenovirus. Combinant la capacitat infectiva de cadascun d'aquest vectors amb la presència d'un factor neurotròfic en el seu genoma, s'observen teràpies més eficients pel tractament de la neuropatia que no mitjançant vectors no virals.

Els HSV s'han usat sobretot per la seva capacitat d'infectar neurones i retrotransportar-se fins al nucli de la neurona i mantenir-se en estat latent. Estudis realitzats en ratolins diabètics amb HSV-NGF, quan s'administrava subcutani, aquest protegia de la pèrdua de la CNAP amb un 30% en els animals tractats amb HSV-NGF subcutani, aconseguint valors pròxims als controls, però no s'observen millores en la velocitat de conducció nerviosa sensorial. Per augmentar els nivells en sèrum de NGF, es va injectar també el vector a teixit adipós, aquest sistema també generava una resposta positiva a la CNAP, però la vida mitja de NGF a sèrum no era suficient per mantenir l'efecte (Goss *et al.*, 2002). HSV-NGF subcutani també presenta la capacitat de retardar l'aparició de la hiperalgèsia, associada a estadis inicials de neuropatia diabètica (Walwyn *et al.*, 2006).

Altres factors neurotròfics codificats per aquest vector són VEGF i NT-3. Tant HSV-VEGF com HSV-NT3, són injectats subcutaniament, a coixinets. Quan s'injecta VEGF s'observa una millora de la CNAP del 50% respecte els ratolins diabètics no tractats, però en canvi no observen canvis a nivell de velocitat de conducció nerviosa sensorial ni motora. Disminueixen la pèrdua de fibres cutànies amb un 75% respecte els ratolins diabètics no tractats i mitjançant estudis de sudoració s'observa que aquests factors també preserven la funció nerviosa autònoma augmentant el nombre de gotes de suor 3 vegades les comptabilitzades en ratolins diabètics no tractats (Chattopadhyay *et al.*, 2005a; Chattopadhyay *et al.*, 2007).

Els Adenovirus també s'han utilitzat com a teràpia viral per neuropatia diabètica, tot i que, aquests vectors tinguin un tropisme cel·lular ampli i no específic per neurones. Estudis realitzats

en models murins amb diabetis induïda per STZ, es van injectar a nivell muscular Ad-CNTF, -BDNF, -NT3, -GDNF, -IGF-I, on principalment es va observar un augment de neurones motores, que al mateix temps, suposava una recuperació parcial de la pèrdua de velocitat de conducció nerviosa motora i sensorial que es produeix en diabetis (Pradat *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009).

AAV-IGF-I s'ha usat també en estudis per malalties com l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS). L'administració d'AAV-IGF-I directe a cervell, en un model murí per aquesta malaltia, s'observa la presència d'IGF-I en les diferents regions de la medul·la espinal, transduïnt principalment neurones motores (ChAT+) en un 30% més que els animals injectats amb un vector control, tot i així no s'observen canvis significatius a nivell motor. Si l'administració del vector codificant per IGF-I es produeix via intramuscular, aquest promou una supervivència del 78% més de neurones motores respecte els ratolins tractats amb el vector control i un 66% de les neurones sensorials (Kaspar *et al.*, 2003; Dodge *et al.*, 2008).

En malalties desmielinitzants com l'Adrenoleucodistròfia (ALD) l'administració intratecal d'AAV6-IGF-I en un model murí per aquesta malaltia, observen una lleugera recuperació de l'activitat motora i un augment del 30% de fibres mielinitzades respecte els animals no tractats (Mastroeni *et al.*, 2009).

III.OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi era el d'obtenir un vector de teràpia gènica capaç de transduir eficientment el sistema nerviós perifèric per tal d'utilitzar-lo com a vector de transferència gènica per administrar el factor de creixement similar a la insulina I (IGF-I) en un model murí de neuropatia diabètica.

Amb aquest objectiu final, ens vam plantejar una sèrie d'objectius intermitjos:

- 1- Caracteritzar el tropisme *in vitro* de diferents pseudotips de vectors adeno-associats (AAV1, AAV2, AAV8 i AAVrh10) per transduir cultius organotípics de ganglis de l'arrel dorsal.
- 2- Caracteritzar el tropisme, la biodistribució i l'estabilitat de diferents pseudotips de vectors adeno-associats per transduir *in vivo* el sistema nerviós perifèric mitjançant diferents vies d'administració (intracoixinets, intraciàtic, intramuscular i intratecal).
- 3- Administrar IGF-I mitjançant vectors AAV1 o AAVrh10 per via intratecal a un model murí que combina diabetis amb lesió a nervi perifèric, utilitzat com a model de neuropatia diabètica.
- 4- Caracteritzar la sobreexpressió d'IGF-I a sistema nerviós perifèric, confirmar, a nivell molecular, l'activació de la seva via de senyalització intracel·lular i la seva capacitat d'induir regeneració i mielinització del nervi lesionat.
- 5- Determinar si la sobreexpressió d'IGF-I a sistema nerviós perifèric mitjançant vectors de teràpia gènica era suficient per aconseguir millorar els símptomes electrofisiològics i anatomopatològics en el model de neuropatia diabètica.

IV.RESULTATS

PART I: TROPISME DE DIFERENTS VECTORS ADENO-ASSOCIATS A SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC

Pel tractament de neuropaties mitjançant teràpia gènica, ja siguin hereditàries o adquirides, i també pel tractament de malalties neuromusculars i pel dolor és necessària una transducció eficient del sistema nerviós perifèric. Per aquest motiu vam voler caracteritzar el tropisme i l'eficiència de transducció de diferents serotips de vectors Adeno-associats en aquest teixit.

Per això es va generar un plàsmid que codificava per la proteïna verda fluorescent (GFP). L'expressió d'aquesta proteïna ens va permetre monitoritzar l'eficiència de transducció i el tropisme cel·lular específic dels diferents serotips d'AAV.

1. Construcció de genomes virals de vectors Adeno-associats

Per tal de clonar la GFP al plàsmid *pAAV-CAG-PLK-WPRE*, es van digerir els plàsmids *pRSV-GFP* i *pAAV-CAG-PLK-WPRE* amb els enzims de restricció *HindIII* i *NheI*, seguidament el fragment que codifica per la GFP es va clonar dins del plàsmid *pAAV-CAG-PLK-WPRE* (Figura 14).

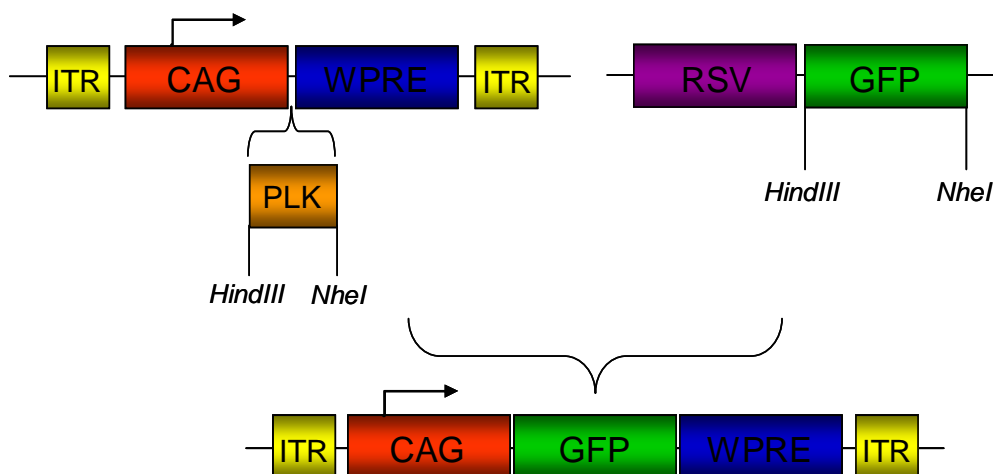


Figura 14: Construcció del plàsmid *pAAV-CAG-GFP-WPRE*.

2. Estudi del tropisme *in vitro* dels serotips de virus Adeno-associats

Com a pas previ a la caracterització del tropisme *in vivo* dels vectors virals utilitzats en aquest treball, primer es va caracteritzar el tropisme i l'eficiència dels AAV en cultius *ex vivo* de ganglis de l'arrel dorsal. Als ganglis de l'arrel dorsal s'hi troben els cossos cel·lular de les

neurones perifèriques sensorials, aquests es poden cultivar *in vitro* durant 12 dies sense perdre viabilitat tal i com s'indica a l'apartat 4.1 de materials i mètodes. Per caracteritzar el tropisme neuronal dels vectors AAVs, es van infectar cultius de ganglis de l'arrel dorsal (DRG), de ratolins adults. Un cop extrets els DRG es mantenien en cultiu durant 24 hores. Passades 24 hores s'infectaven els DRG amb $1,5 \cdot 10^8$ partícules virals per gangli i es mantenien en cultiu durant set dies més. L'expressió de la GFP ens va permetre fer un seguiment de l'eficiència de transducció dels DRG i poder realitzar una primera classificació visual de les estructures cel·lular transduïdes pels dos vectors. Per microscòpia de fluorescència es va observar que entre 48 i 72 hores després d'infectar els explants de DRG, ja es podien percebre cèl·lules que expressaven el transgen GFP, sobretot pels serotips AAV1 i AAVrh10. Es va observar un augment progressiu en el temps, del nombre de cèl·lules traduïdes i dels nivells d'expressió de GFP. La GFP s'expressa a citosol, el que ens va permetre observar la morfologia de les estructures cel·lulars transduïdes pels vectors. Les cèl·lules que expressaven clarament GFP corresponien a les neurones sensorials, amb cossos neuronals arrodonits i grans, i amb les prolongacions axonals també marcades amb GFP.

Comparativament AAVrh10 presentava una eficiència major de transducció a DRG que AAV1, en les mateixes condicions, transduïnt un 45% de neurones, en canvi AAV1 transduïa un 38% de neurones per DRG. Els DRG infectats amb AAVrh10 presentaven més neurones transduïdes i la intensitat de l'expressió de GFP era més elevada.

Amb els serotips AAV2 i AAV8GFP, es va obtenir una eficiència de transducció baixa comparada amb els serotips AAV1 i AAVrh10. Per tant ens vam centrar en caracteritzar el tropisme neuronal *in vitro* per AAV1 i rh10.

Com s'ha explicat a la introducció, els DRG contenen diferents tipus de neurones sensorials. Amb la finalitat de determinar els tipus de neurones transduïdes, vam analitzar immunohistoquímicament els DRG infectats per cada vector.

L'anàlisi immunohistoquímic pel vector AAV1GFP, es pot observar a la Figura 15 i l'anàlisi immunohistoquímica pel vector AAVrh10 a la Figura 16.

Amb un marcador específic de nuclis de neurones, NeuN, vam confirmar que tant el vector AAV1 com AAVrh10 marcaven específicament neurones a DRG *in vitro*. Per poder classificar quins tipus de neurones transduïa específicament cada vector, vam utilitzar els marcadors neuronals com Neurofilament 200 (NF-200) i periferina. NF-200 marca neurones de diàmetre gran i mielinitzades, en canvi, la periferina s'uneix específicament a neurones de diàmetre petit, principalment fibres C dels DRG.

En estudis d'immunohistoquímica de seccions de DRG infectades tant per AAV1 com AAVrh10 vam observar un percentatge semblant de neurones positives per GFP. Per ambdós vectors vam comptar un 40% de neurones NF-200 positives i un 60% de neurones perifèrica positives que colocalitzaven amb GFP.

Les neurones sensorials es poden classificar de diverses maneres, per la morfologia, per la velocitat de conducció nerviosa o per la resposta a neuropèptids. Dins de les neurones sensorials petites (perifèrica), en podem distingir de dos tipus, les que responen a neuropèptids i les que no responen a neuropèptids. Per caracteritzar quin dels dos tipus de neurones sensorials petites infecten millor els dos vectors, es van utilitzar els marcadors neuronals específics, CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) que s'uneix a neurones peptidèrgiques i la isolectina IB4, marcador d'origen vegetal, del llegum *Griffonia simplicifolia*, que s'uneix a neurones sensorials petites no peptidèrgiques.

Es va observar que AAV1 presentava una major eficiència de transducció per neurones positives per IB4, transduint gairebé el 60% de les neurones sensorials petites i un 35 % de neurones CGRP+. En canvi el vector AAVrh10, tot i transduir amb una elevada eficiència els dos tipus de neurones sensorials petites, principalment presentava un major tropisme per neurones CGRP positives (70%), seguit d'un 45% de neurones IB4 positives.

3. Estudi del tropisme d'AAVs *in vivo* a sistema nerviós perifèric

Amb la finalitat de transduir neurones del SNP es van optimitzar diferents vies d'administració (intracoixinets, intramuscular, intragangli, intraciàtic i intratecal).

Es van injectar 9.10^9 vg de vector, per via d'administració. Es va observar que, tot i la capacitat de transduir neurones mitjançant administració directa a coixinets, múscul i gangli, els nivells d'expressió eren molt baixos. Es va observar transducció principalment de neurones a DRG, però l'expressió de la GFP codificada pel vector era gairebé imperceptible, la qual cosa no ens va permetre realitzar assajos d'immunohistoquímica per poder caracteritzar el tropisme neuronal mitjançant aquestes vies d'administració del vector.

Tanmateix, la injecció intra nervi ciàtic i la injecció intratecal si ens van permetre obtenir nivells d'expressió elevats sobretot per AAV1 i AAVrh10 i determinar el tropisme neuronal específic per aquests dos vectors.

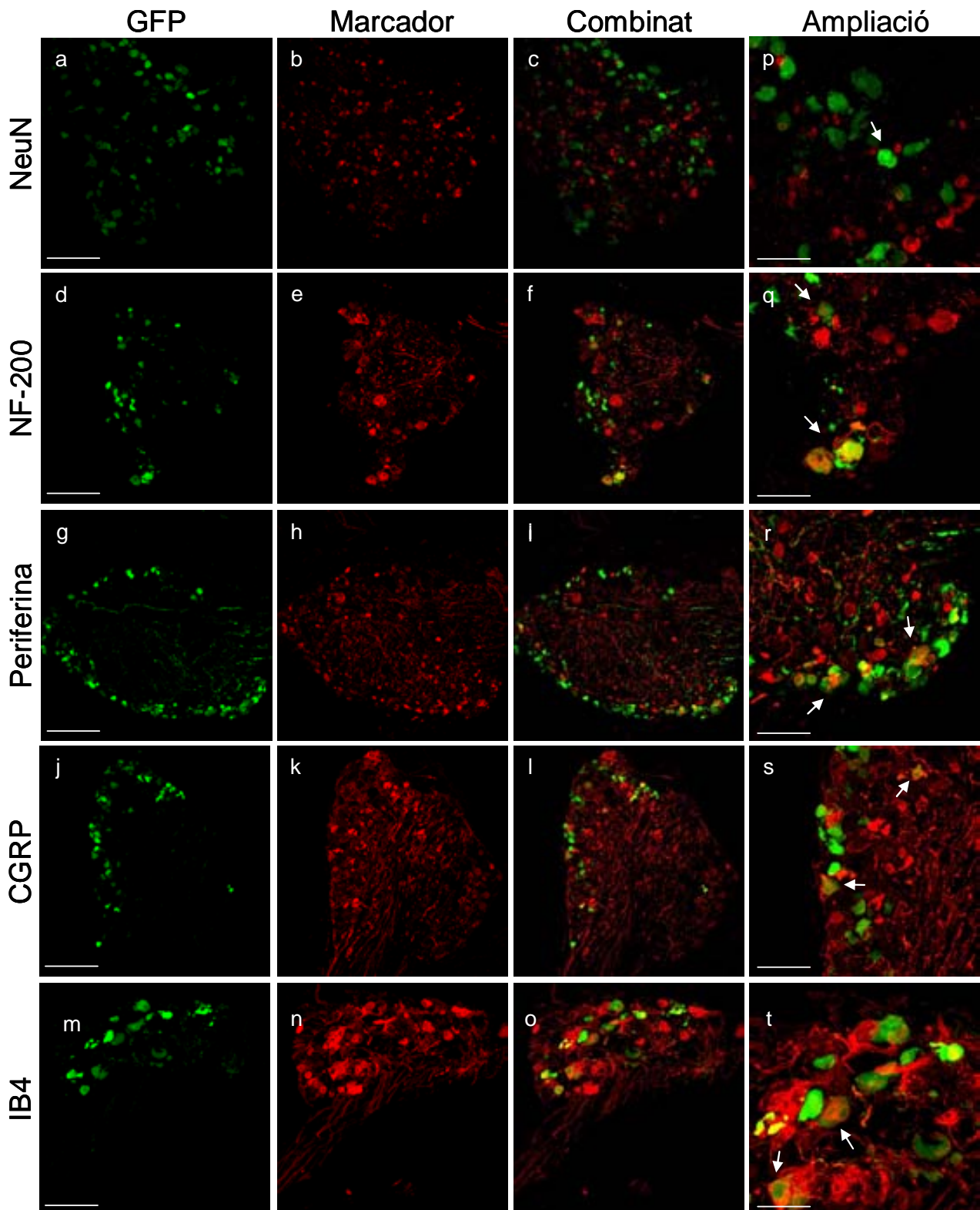


Figura 15: Anàlisi immunohistològica del tropisme neuronal del vector AAV2/1GFP en explants de ganglis de l'arrel dorsal (DRG). Talls histològics de DRG transduïts amb AAV2/1GFP (verd) (a,d,g,j,m), van ser incubats amb anticossos específics per les diferents subpoblacions de neurones sensorials de DRG. Els diferents marcadors neuronals presenten marcatge vermell. NeuN (b), NF-200 (e), Periferina (h), CGRP (k) i IB4 (n). Podem observar colocalització entre neurones transduïdes per AAV1GFP (verd) i els marcadors neuronals específics: NeuN (c), NF-200 (f), periferina (i), CGRP (l) i IB4 (o). (---- 170µm). Ampliació de les imatges on s'observa marcatge combinat de GFP i els marcadors neuronals (p, q, r, s, t). (----100µm). Les fletxes indiquen neurones positives per GFP i per cada marcador neuronal.

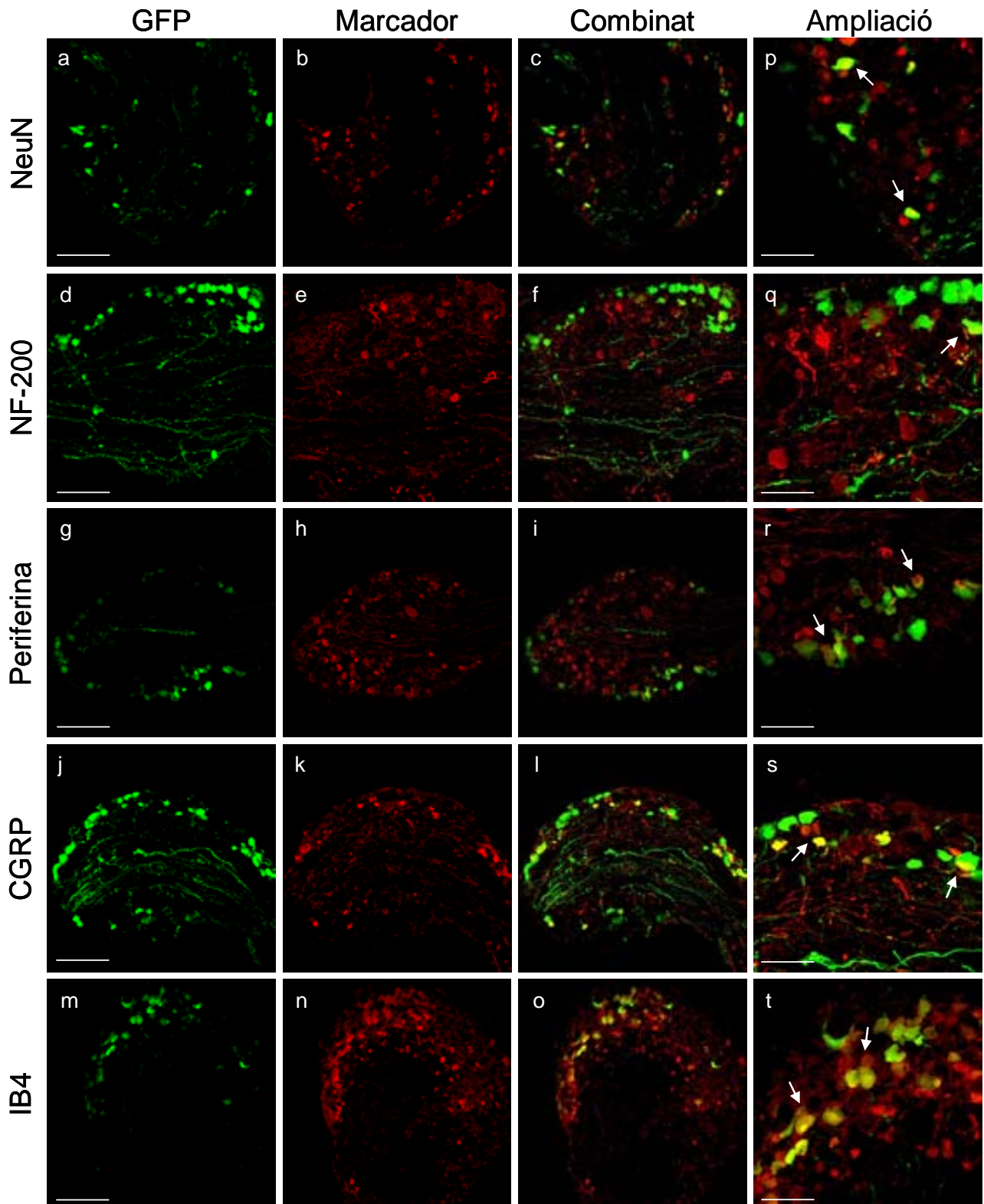


Figura 16: Anàlisi immunohistològica del tropisme neuronal del vector AAV2/rh10GFP en explants de ganglis de l'arrel dorsal (DRG. Talls histològics de DRG transduïts amb AAV2/rh10GFP (verd) (**a,d,g,j,m**), van ser incubats amb anticossos específics per les diferents subpoblacions de neurones sensorials de DRG. Els diferents marcadors específics presenten marcatge vermell. NeuN (**b**), NF-200 (**e**), Periferina (**h**), CGRP (**k**) i IB4 (**n**). Podem observar colocalització entre neurones transduïdes per AAV2/rh10GFP (verd) i marcadors neuronals específics: NeuN (**c**), NF-200 (**f**), periferina (**i**), CGRP (**l**) i IB4 (**o**). (---- 170µm). Ampliació de les imatges on s'observa combinació de GFP i el marcadors neuronals específics (**p, q, r, s, t**). Fletxes indiquen neurones positives pel GFP i pel anticòs neuronal.(---- 100µm).

3.1. Caracterització del tropisme dels vectors AAV a sistema nerviós perifèric mitjançant injecció a nervi ciàtic

L'administració de gens terapèutics a DRG és una via interessant per prevenir mort neuronal i degeneració nerviosa en neuropaties perifèriques. Al començar aquests estudis la transducció de DRG s'havia aconseguit principalment mitjançant la injecció subcutània de vectors virals, utilitzant virus herpes simplex. Aquests tenen la capacitat de retrotransportar-se via axonal fins al soma de les neurones a DRG.

Per poder transduir neurones sensorials *in vivo* amb els vectors AAV, inicialment es va optimitzar el sistema d'injecció intra nervi ciàtic. El nervi ciàtic, és el nervi més gran i més llarg dels diferents nervis espinals que formen el sistema nerviós perifèric. Es presenta de forma simètrica en ambdós costats del cos i està format per fibres nervioses llargues que transcorren des de la medul·la espinal, passant per la regió interna de les natges, fins a arribar a la regió més exterior de les extremitats inferiors (peu). Quan arriba l'altura del genoll es trifurca i dona lloc a tres nervis principals (tríade): el nervi sural, el nervi tibial anterior i el nervi tibial posterior, d'on surten diferents ramificacions que innerven tota l'extremitat inferior fins al peu. Deriva del plexe lumbo-sacral, dels nervis espinals lumbar L4 a sacre S4. Els feixos nerviosos que formen el ciàtic contenen neurones aferents (sensorials) i neurones eferents (motores). Inicialment els feixos nerviosos s'agrupen en una única estructura fins a la divisió o tríade. A partir d'aquest punt, les diferents neurones que el formen es distribueixen en les tres ramificacions principals, on majoritàriament trobem feixos nerviosos de neurones aferents i eferents a nervi tibial, i neurones aferents a nervi sural.

En estudis anteriors realitzats en el nostre grup es va caracteritzar el tropisme dels serotips AAV1, AAV2 i AAV8, quan s'injectaven directament a nervi ciàtic (Homs J *et al.*) (Annex I). Vam observar que AAV2 transduïa únicament neurones, mentre que AAV1 transduïa tant neurones sensorials com cèl·lules de Schwann i en canvi, AAV8 transduïa preferentment cèl·lules de Schwann. Tot i la transducció d'un 4% de les neurones sensorials per part d'AAV2, els nivells de neurones sensorials transduïdes eren més elevats amb AAV1, aproximadament un 7,5%, en canvi, AAV8 quan s'injectava directe a nervi ciàtic només transduïa un 0.5% de les neurones de DRG. A partir d'aquest punt es va continuar amb la caracterització del tropisme *in vivo* del serotip AAV1. Posteriorment es va caracteritzar el serotip AAVrh10, serotip que a l'inici d'aquest treball encara no s'havia descrit. Es van dur a terme els mateixos experiments realitzats amb AAV1 fins aleshores.

Es van injectar ratolins ICR adults amb 9.10^9 vg de cada virus (AAV1-CAG-GFP-WPRE i AAVrh10-CAG-GFP-WPRE) en 3µl de volum final, per nervi ciàtic, seguint el procediment descrit a l'apartat 4.4 de materials i mètodes.

En funció de resultats obtinguts per el nostre grup anteriorment (Homs J *et al.*) (Annex I), els animals es van sacrificar tres setmanes després de l'administració del virus que sol correspondre al pic d'expressió. Es van obtenir mostres de nervi ciàtic, ganglis de l'arrel dorsal de la regió lumbar (L4-6) i medul·la espinal de la regió lumbar, i es va analitzar per immunohistoquímica el tropisme del dos vectors.

La presència de la proteïna verda fluorescent al casset d'expressió del genoma viral, ens va permetre fer un seguiment de les estructures cel·lulars transduïdes *in vivo*. Mitjançant microscòpia de fluorescència es va fer una anàlisi visual de les estructures cel·lulars transduïdes pels vectors. Quan s'injectava AAV1 s'observava transducció de neurones a DRG, però amb un nombre molt petit, entre un 5 i un 7% de neurones transduïdes per gangli, i a nivell de nervi ciàtic gran part de l'expressió del vector es limitava al lloc d'injecció. En canvi, quan el vector administrat era AAVrh10, els nivells de transducció de neurones eren molt més alts, es va observar un promig de 33% de neurones transduïdes per tall de DRG.

Es van realitzar assajos immunohistoquímics amb PGP 9.5 (*protein gene product 9.5*) marcador específic de neurones i S.100 que és un marcador específic de cèl·lules de Schwann. Es van incubar seccions de nervi ciàtic transduïdes pels dos vectors, amb els marcadors PGP 9.5 i S100, i les seccions de DRG amb el marcador neuronal PGP 9.5. En el nervi ciàtic injectat amb AAV1 (Figura 17A) vam observar colocalització de cèl·lules GFP positives tant amb PGP 9.5 com amb S100. Les estructures cel·lulars positives per GFP i PGP 9.5 equivalien a les fibres axonals de neurones transduïdes pel vector, però, per altra banda també es van observar cèl·lules positives per GFP i S100, corresponents a cèl·lules de Schwann. Per tant AAV1 no només infecta neurones si no també cèl·lules de Schwann quan s'injecta a nervi ciàtic. A DRG totes les cèl·lules que expressaven el transgen, eren positives també per PGP 9.5 (Figura 17B), indicant que l'AAV1 injectat intraciàtic migra fins al nucli de les neurones sensorials a través del transport retrògrad axonal.

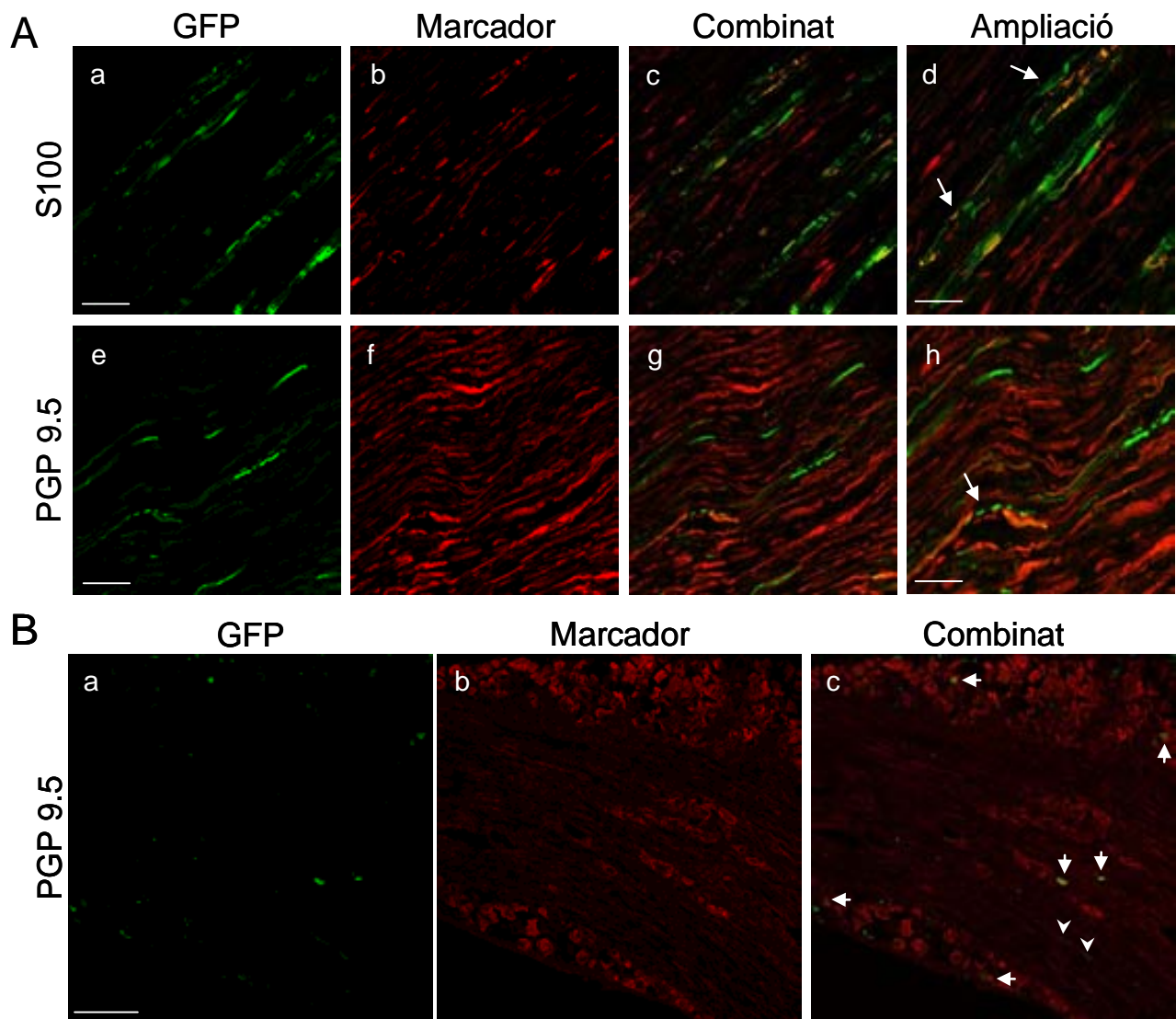


Figura 17: Estudi del tropisme de AAV2/1GFP a nervi perifèric mitjançant injecció intra nervi ciàtic. A) Anàlisi immunohistoquímica en talls histològics de nervi ciàtic transduïts amb AAV2/1GFP (verd) (a i e), incubats amb PGP 9.5 (vermell) (f), marcador específic de neurones, i S.100 (vermell) (b), marcador específic de cèl·lules de Schwann. Combinat de GFP i S100 (c) i PGP 9.5 (g) (----42µm). Ampliació de les imatges on s'observa colocalització amb neurones PGP 9.5 (h, fletxa) i SC amb S100 (d, fletxes) (----21µm). **B)** Tall histològic de DRG transduït per AAV2/1GFP (a) injectat a nervi ciàtic. Marcatge amb PGP9.5 (vermell) (b) i neurones transduïdes AAV2/1GFP (verd) (c). Les fletxes indiquen colocalització de neurones GFP i PGP 9.5 i els caps de fletxa senyalen SC GFP+. (----130µm).

En mostres de nervi ciàtic transduïdes per AAVrh10 totes les cèl·lules GFP positives colocalitzaven amb PGP 9.5, en canvi, quan s'incubava amb S100 no s'observava colocalització entre les cèl·lules marcades amb S100 i les transduïdes pel vector. A diferència del que succeeix amb AAV1, quan s'injecta AAVrh10 intra ciàtic només es transdueixen neurones. A DRG totes les cèl·lules GFP positives colocalitzen amb el marcador neuronal PGP 9.5 (Figura 18).

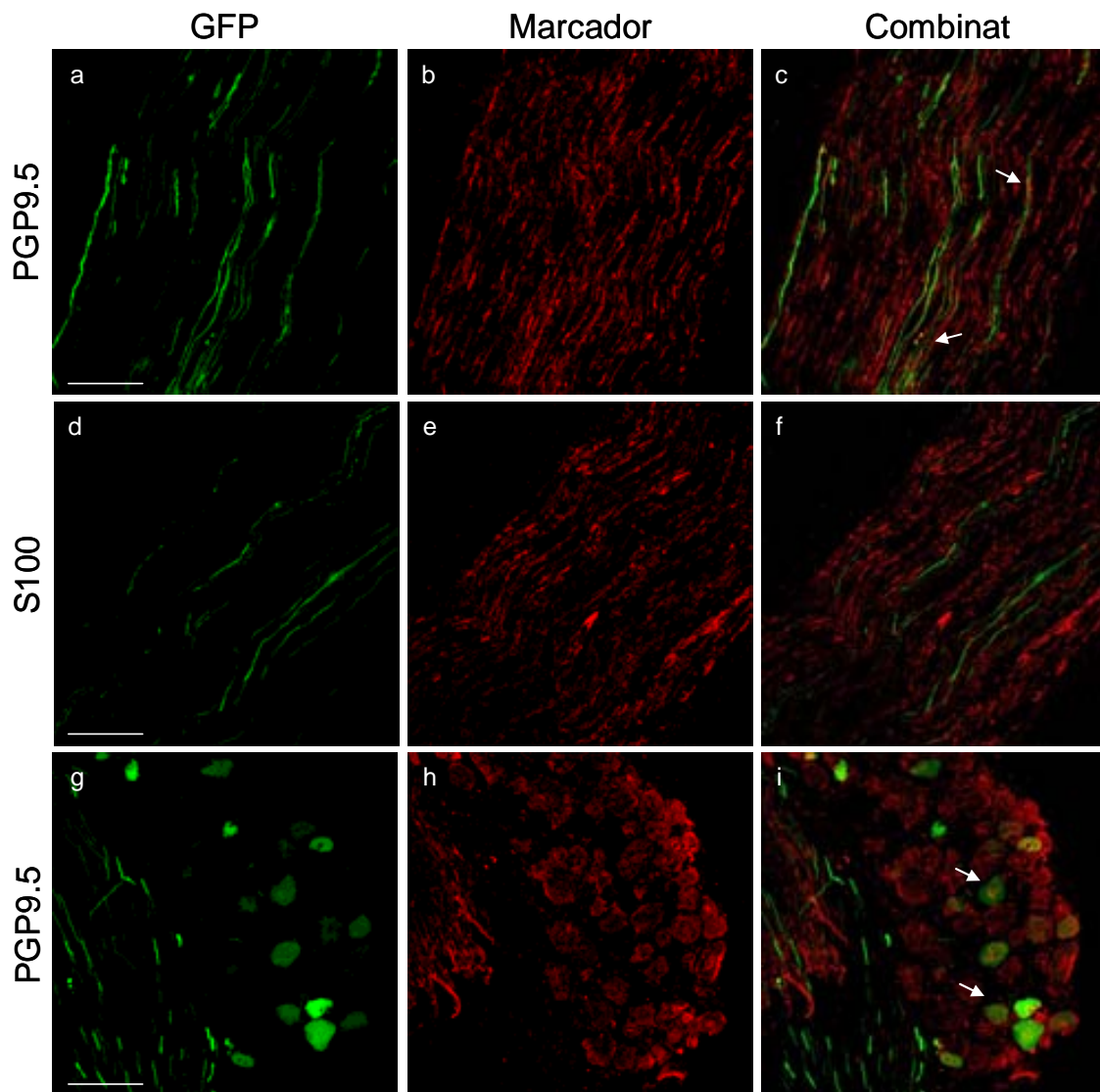


Figura 18: Estudi del tropisme de AAV2/rh10GFP a nervi perifèric mitjançant injecció intra nervi ciàtic. Anàlisi immunohistoquímica en talls histològics de nervi ciàtic transduïts amb AAV2/rh10GFP (verd) (a i d), incubats amb PGP 9.5 (vermell) (b), marcador específic de neurones, i S.100 (vermell) (e), marcador específic de cèl·lules de Schwann. Colocalització de cèl·lules GFP positives amb PGP 9.5 (c) i S100 (f). Tall histològic de DRG transduït per AAV2/rh10GFP injectat a nervi ciàtic (g), marcatge amb PGP9.5 (vermell) (h). (i) DRG amb marcatge positiu per PGP 9.5 i neurones transduïdes per AAV2/rh10GFP (verd) (----81µm). Les fletxes senyalen (c) cossos neuronals positius per GFP i PGP 9.5; (i) Cossos neuronals marcats amb GFP i PGP 9.5.

També vam analitzar talls de medul·la espinal de la regió lumbar (ME) per comprovar si els AAVs eren capaços d'infectar neurones motores a través dels seus axons, situats al nervi ciàtic. Es van fer talls transversals de ME i es van observar per microscòpia de fluorescència. Principalment el marcatge es localitzava amb els dos vectors en les fibres axonals de l'arrel dorsal, on es troben les prolongacions axonals de les neurones sensorials o aferents (DRG) que entren a medul·la espinal. Tanmateix, el marcatge era tan feble marcatge pels dos vectors, que no ens va permetre fer un seguiment de les estructures transduïdes per immunohistoquímica.

3.2. Caracterització del tropisme dels vectors AAV a sistema nerviós perifèric mitjançant injecció intratecal

La punció lumbar està àmpliament utilitzada com a mètode d'accés per l'anestèsia peridural i per la introducció d'agents terapèutics i diagnòstics en humans. El procés és prou segur com per evitar dany a medul·la espinal i a les arrels nervioses.

Es va injectar $1 \cdot 10^{11}$ partícules virals en 10µl de volum final a l'espai subaracnoideu de ratolins ICR adults, de cada vector. Els animals es van sacrificar tres setmanes després de l'administració del vector.

La infusió del virus a líquid cefaloraquídi permet que aquest difongui al llarg del sistema nerviós, i així permetre la transducció d'estructures allunyades del lloc d'injecció. Per aquest motiu, es van extreure mostres de DRG i de medul·la espinal de les regions lumbar, toràctica i cervical. Es van fer seccions de les diferents regions de DRG i ME extretes, per cadascun dels vectors, i es van sotmetre a una anàlisi visual per microscòpia de fluorescència.

Fent una anàlisi exhaustiva de seccions de DRG i ME de les diferents regions, es va observar que AAV1 només presentava marcatge amb GFP a DRG de la regió lumbar al voltant del lloc d'injecció, i no es va observar senyal a medul·la espinal. Finalitzat aquest estudi preliminar, es van analitzar per immunohistoquímica, les seccions de DRG amb cèl·lules GFP positives. Es van incubar amb els marcadors neuronals PGP 9.5, NF-200 i periferina, per fer un classificació inicial del tropisme neuronal d'AAV1 injectat via intratecal. L'eficiència de transducció de AAV1GFP per neurones sensorials era d'un 15% de neurones GFP+, a la Figura 19 es mostra colocalització de neurones GFP+ tant amb PGP 9.5, NF-200 com periferina.

D'altra banda, els teixits obtinguts dels animals injectats amb AAVrh10 quan s'observaven sota una lupa de fluorescència ja indicaven que aquest serotip era molt més eficient que AAV1 (Figura 20).

Així, quan s'analitzaven les seccions de DRG i medul·la espinal, de les diferents regions transduïdes per AAVrh10, s'observaven cèl·lules GFP positives a diferents regions del SNP, és a dir, AAVrh10 té la capacitat de difondre pel sistema nerviós perifèric i transduir ganglis de l'arrel dorsal i també regions de medul·la espinal, allunyats del punt d'injecció.

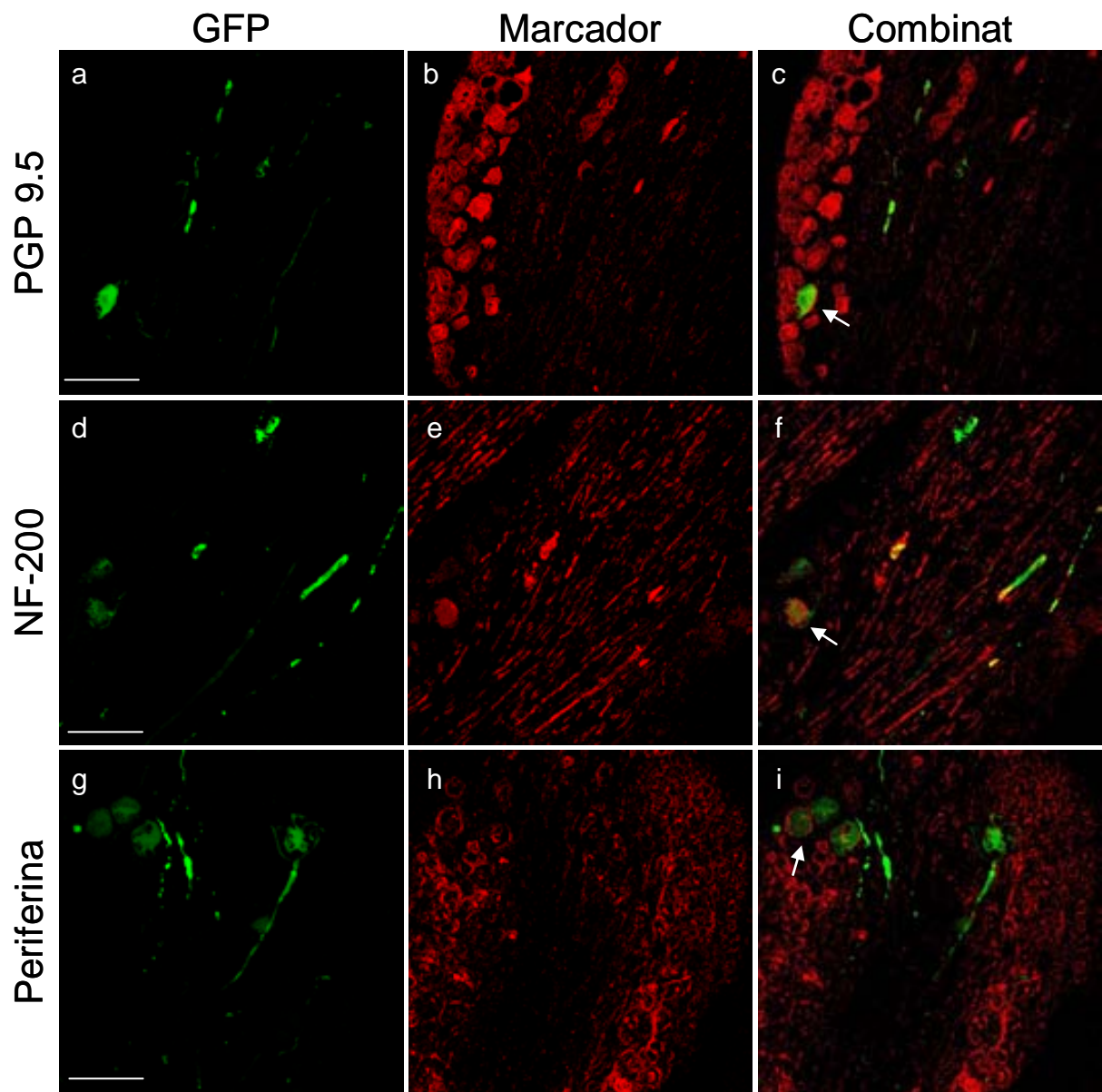


Figura 19: Estudi del tropisme *in vivo* de AAV2/1GFP injectat via intratecal. Talls histològics de ganglis de l'arrel dorsal amb cèl·lules transduïdes específicament amb AAV2/1GFP (verd) (**a**, **d** i **g**); Anàlisi immunohistoquímica del talls transduïts amb AAV1GFP, incubats amb PGP 9.5 (marcador neuronal) (**b**), NF-200 (anticòs específic per neurones sensorials grans) (**e**), i Periferina (anticòs específic per neurones sensorials nociceptives) (**h**), (vermell). Observem colocalització amb els diferents marcadors neuronals i neurones transduïdes per AAV2/1GFP (**c**, **f**, **i**). (----135 μ m). Les fletxes indiquen marcatge positiu per GFP i pel marcador neuronal.

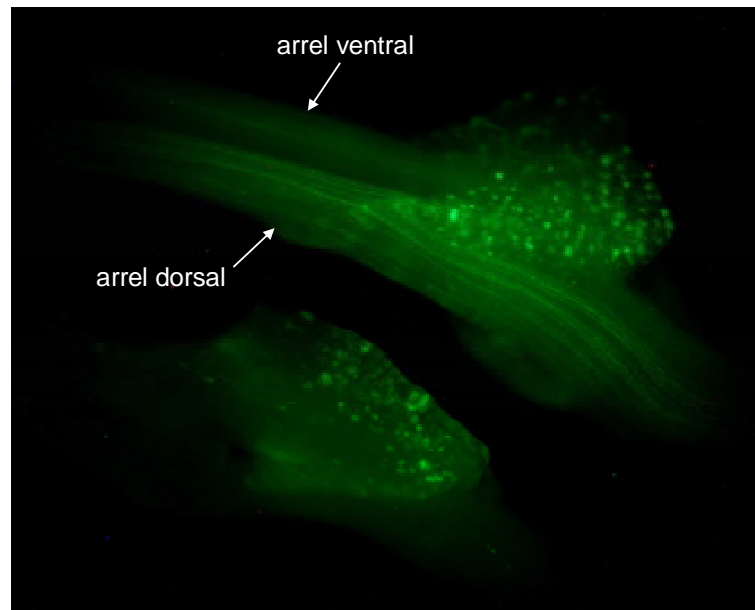


Figura 20: Imatge de DRGs transduïts amb AAVrh10GFP via intratecal, captada a 10x d'augment amb lupa de fluorescència. S'observa marcatge als cossos neuronals i també a l'arrel dorsal i ventral dels ganglis.

Per tant, a diferència d'AAV1, el vector AAVrh10 té la capacitat de transduir la medul·la espinal, on s'hi localitzen els somes de les neurones motores. Les neurones motores estan situades a la regió ventral de la medul·la espinal, les seves prolongacions axonals es troben majoritàriament a les arrels ventrals de la medul·la espinal i aquestes a la vegada formen part dels nervis perifèrics, juntament amb les neurones sensorials.

Per analitzar el tipus de neurones transduïdes per AAVrh10 a DRG, es van incubar talls de DRG de 10µm de gruix, amb els diferents marcadors neuronals utilitzats fins aleshores : NF-200, periferina, CGRP i IB4.

A la Figura 21, es poden observar imatges obtingudes per microscòpia confocal, que ens permeten observar colocalització entre neurones GFP positives i els diferents marcadors. Les neurones sensorials principalment transduïdes per AAVrh10GFP eren les neurones petites, amb un 60% neurones positives per periferina. Dins d'aquest grup AAVrh10 traduïa un 30% de neurones positives per CGRP, neurones peptidèrgiques i amb un 11% neurones IB4 positives, que són neurones no peptidèrgiques. Es va observar també marcatge de neurones sensorials grans, fibres A, tot i que amb un percentatge més baix doncs aproximadament es marcaven amb NF-200 un 13% de cèl·lules positives per GFP.

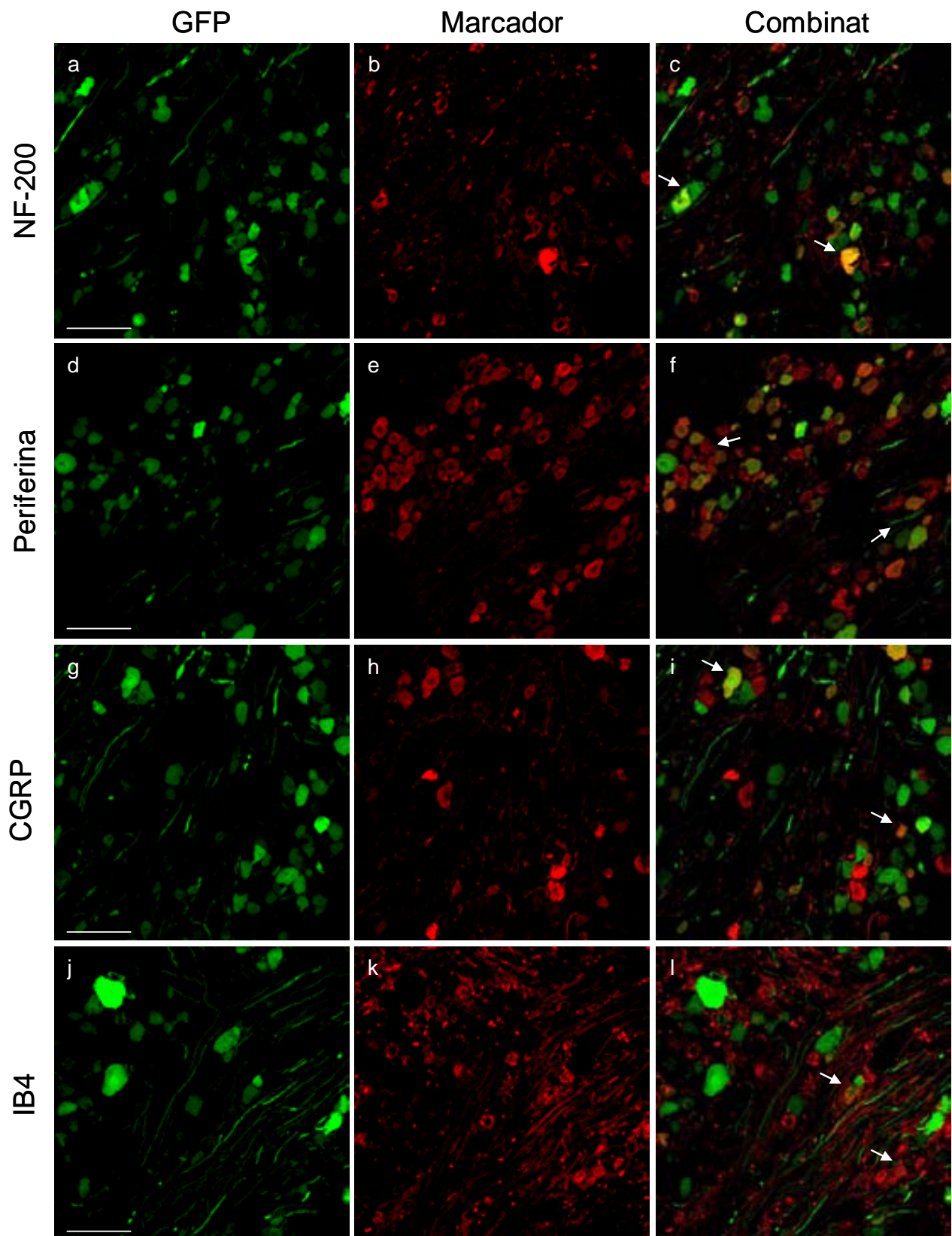


Figura 21: Estudi del tropisme neuronal específic del vector AAV2/rh10GFP administrat via intratecal. Anàlisi immunohistoquímic de talls de DRG transduïts amb el vector AAV2/rh10GFP, (verd, **a**, **d**, **g**, **j**), van ser incubats amb marcador neuronal; NF-200 (**b**), Periferina (**e**), CGRP (**h**) i IB4 (**k**). Observem colocalització de neurones GFP positives (verd) amb els marcadors neuronals (vermell) (**c**, **f**, **i**, **l**). (----81µm). Les fletxes indiquen marcatge positiu per GFP i pel marcador neuronal.

Mitjançant microscòpia de fluorescència vam observar marcatge d'estructures cel·lulars a ME. Principalment el marcatge es localitzava a l'arrel dorsal, regió per on entren a ME els axons de les neurones sensorials i també marcatge a la regió ventral de la ME, on es localitzen els nuclis de les neurones motores.

A la figura 22 es mostren seccions representatives de la regió dorsal i la regió ventral de ME, d'imatges captades per microscòpia confocal.

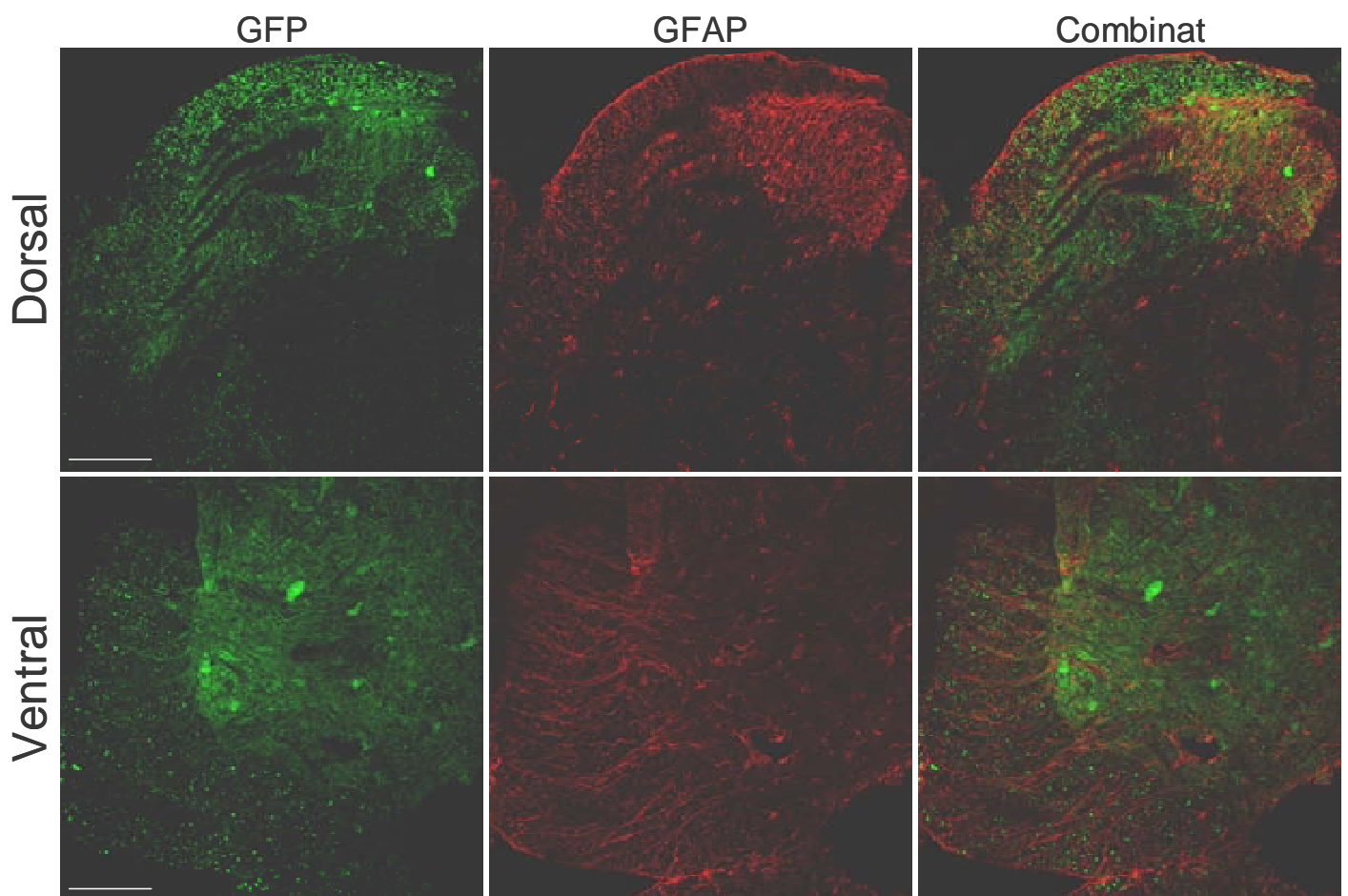


Figura 22: Tall histològic de medul·la espinal transduïda amb AAVrh10GFP mitjançant injecció intratecal. Marcatge amb GFAP de la regió dorsal i ventral de la ME (----146µm).

A medul·la espinal, amb el vector AAVrh10GFP es visualitzen estructures GFP positives majoritàriament a la regió ventral de les ME transduïdes, amb unes característiques molt similars a les neurones motores. Presentaven una estructura ovoide i emetien prolongacions a les arrels ventrals de la ME. Per corroborar que aquestes estructures transduïdes eren neurones motores, es van realitzar assajos immunohistoquímics a seccions de ME d'unes 20µm de gruix. Els marcadors utilitzats en aquests assajos eren un marcador específic de neurones motores colinèrgiques, ChAT (*Choline Acetyltransferase*) un marcador específic d'astròcits, GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), APC1 (*Anaphase promoting complex 1*) marcador d'oligodendròcits i Iba1 (*Ionized calcium-binding adaptor molecule-1*), marcador específic de microglia.

Com es pot observar a la Figura 23, quan s'incubaven els diferents marcadors amb talls de ME transduïts, només s'observava colocalització de cèl·lules GFP positives amb ChAT, en canvi no s'observava colocalització ni amb GFAP ni amb Iba1. En ocasions molt puntuals, vam observar marcatge positiu de cèl·lules GFP amb APC1, marcador específic per oligodendròcits (menys d'una cèl·lula per secció). Per tant podem dir que AAVrh10 transduïx principalment neurones motores a medul·la espinal.

Es va quantificar que AAVrh10 transduïa aproximadament un 40% de neurones motores per secció de ME (Figura 23).

A més de la capacitat infectiva d'AAVrh10 per neurones motores, podem observar a la figura 24, una imatge representativa d'un tall longitudinal de la regió ventral de la medul·la espinal, on veiem que el vector no només infecta neurones del costat on es realitza la injecció intratecal, si no que també infecta neurones de la regió contralateral del lloc d'injecció, degut segurament a la difusió del vector en el LCR.

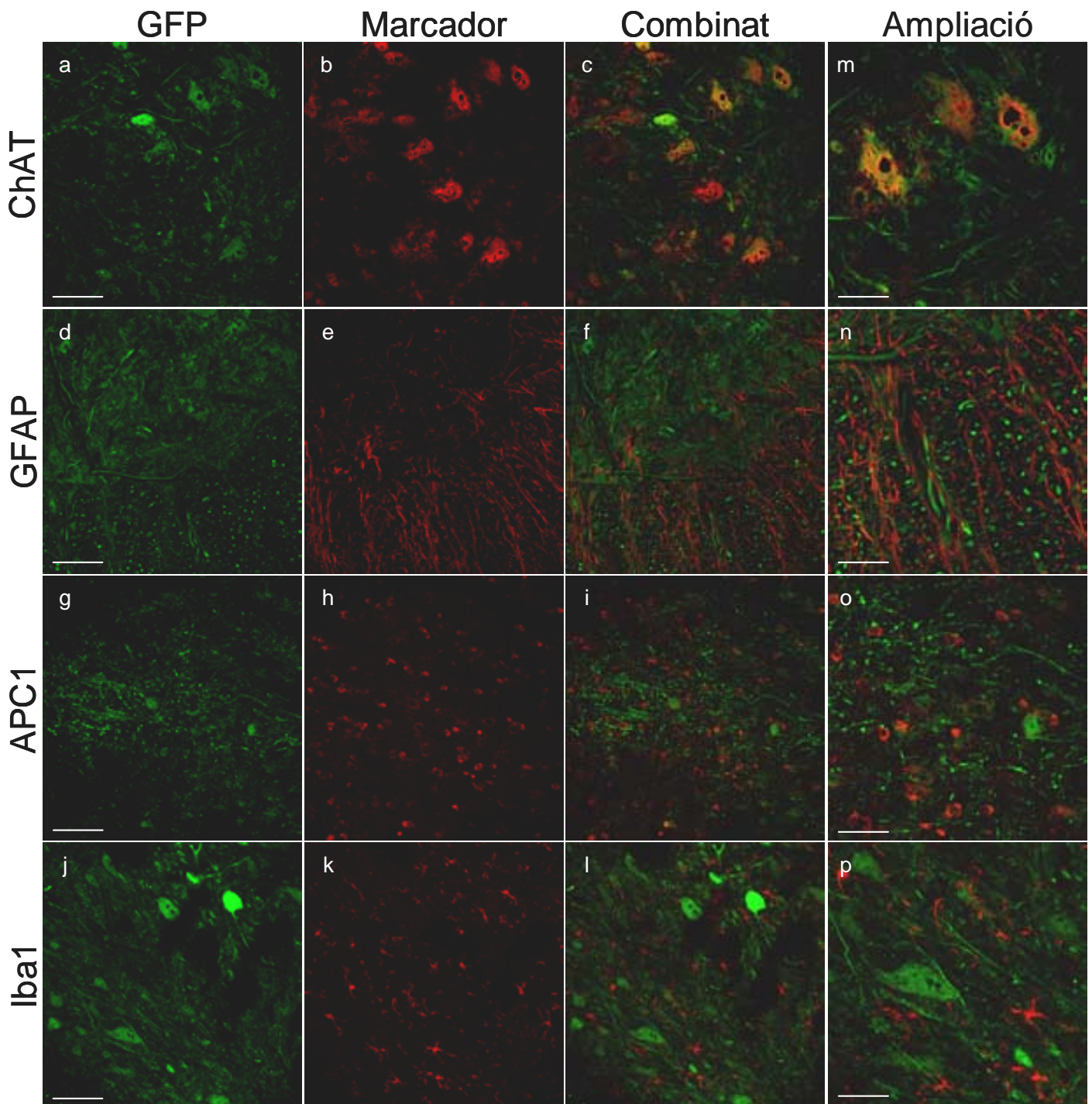


Figura 23: Caracterització del tropisme del vector AAV2/rh10GFP a medul·la espinal. Anàlisi immunohistoquímica de seccions de ME (20µm gruix) transduïdes amb AAV2/rh10GFP (**a, d, g, j**), incubats amb marcadors específics per neurones motores ChAT (**b**), astròcits GFAP (**e**), oligodendròcits APC1 (**h**) i microglia Iba1 (**k**). Combinat de GFP i els diferents marcadors: ChAT (**c**), GFAP (**f**), APC1 (**i**), Iba1 (**j**) (----70µm). Imatges del combinat augmentades per cada anticòs (**k, l, m, n**). (----31 µm).

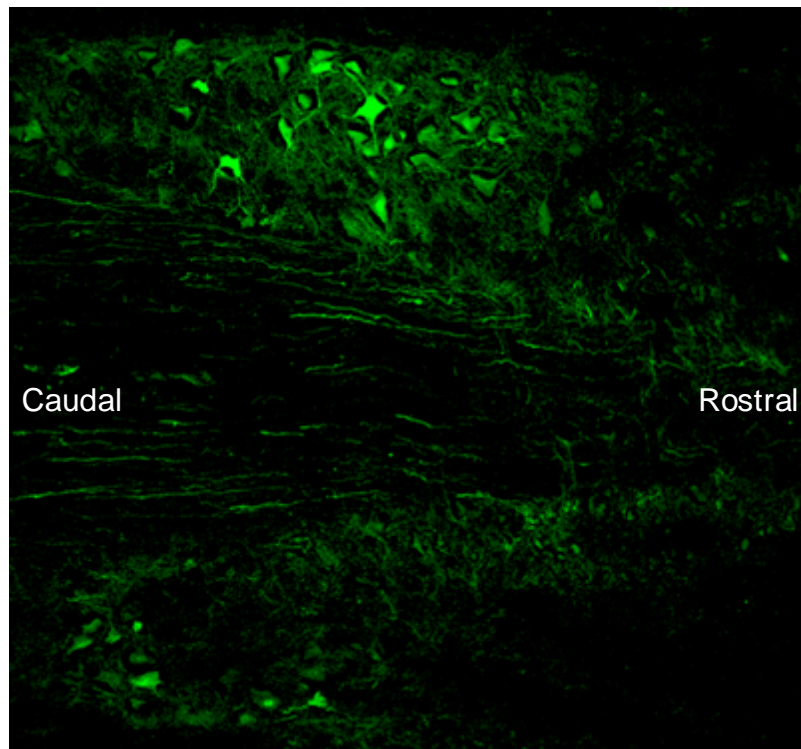


Figura 24: Capacitat de transducció del vector AAV2/rh10GFP a medul·la espinal. Tall longitudinal de la part ventral de ME de la regió toràctica, transduïda amb AAV2/rh10GFP, on s'observa marcatge amb GFP en ambdós costats de la ME. (200x).

3.2.1. Estudi de l'estabilitat *in vivo* dels vectors AAV1 i AAVrh10 administrats via intratecal

Es va determinar l'estabilitat dels vectors AAV1 i AAVrh10 *in vivo* analitzant l'expressió del transgen a diferents temps, setmana 1, 3, 6 i 10. Per això, es van injectar mitjançant injecció intratecal ratolins ICR adults amb $1 \cdot 10^{11}$ partícules virals per animal de cada vector, en $10 \mu\text{l}$ de volum final.

En funció dels resultats descrits anteriorment per AAV1 vam processar només mostres de DRG pròximes al lloc d'injecció, i per AAVrh10 es van processar mostres de les diferents regions de sistema nerviós perifèric de DRG i també de ME.

3.2.1.1. Estudi de l'estabilitat del vector AAV1 a sistema nerviós perifèric

Es va injectar un AAV1 que contenia un casset d'expressió amb el gen LacZ, que codifica per l'enzim β -galactosidasa. En presència d'un substrat específic, l'enzim β -galactosidasa catalitza la degradació del substrat donant lloc a un producte que emet unitats de llum, les quals es poden quantificar mitjançant un luminòmetre i així obtenir valors d'unitats relatives de llum respecte els nanograms de proteïna del teixit analitzat.

Els animals es van sacrificar per decapitació als diferents temps analitzats i es van extreure mostres de teixit nerviós en fresc de DRG de la regió lumbar: superior (DRG L1-3) i inferior (DRG L4-6) (Figura 25).

El lloc d'administració es troba entre les vèrtebres L3-L4. Els resultats mostren que no hi ha diferències significatives entre la regió superior o inferiors dels ganglis lumbar ni entre els diferents punts de temps assajats, tot i que hi ha un pic d'expressió a setmana 3. Malgrat això els nivells de β -galactosidasa a setmana 10 es mantenen com a setmana 1 i a setmana 6.

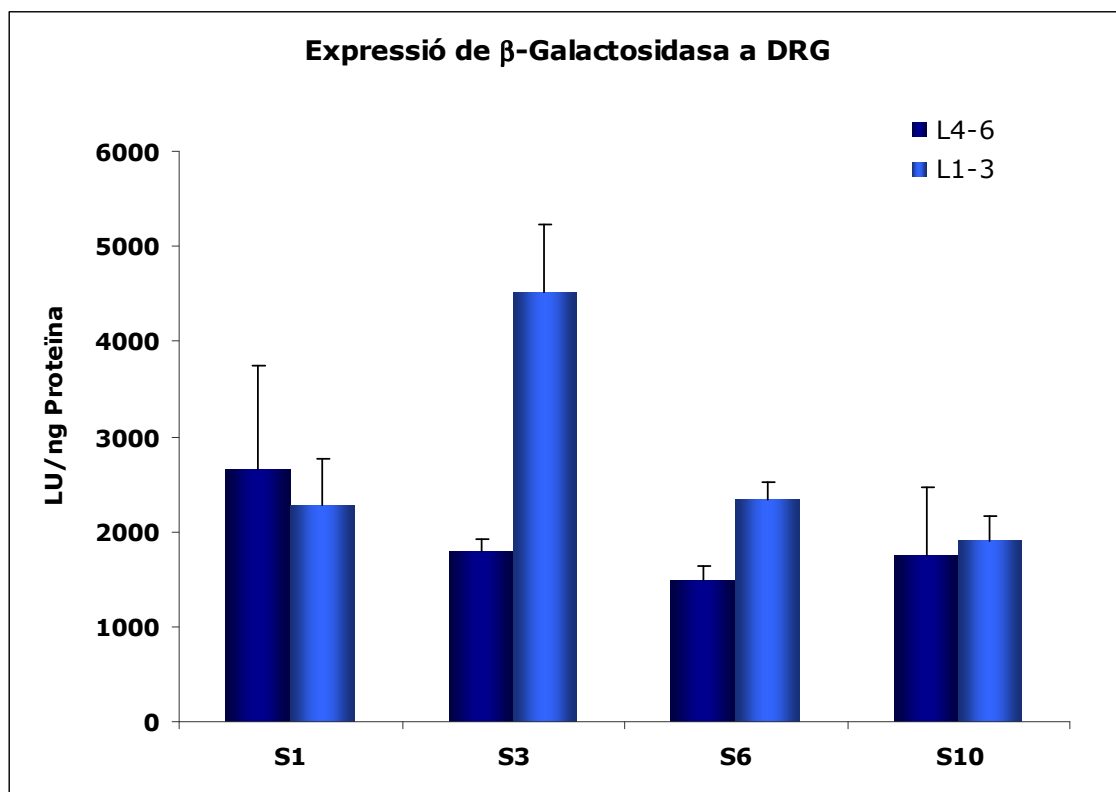


Figura 25: Estudi de l'estabilitat *in vivo* de AAV1nlsLacZ injectat intratecal. Anàlisi de l'activitat β -galactosidasa a ganglis de l'arrel dorsal de la regió lumbar L3-1 i L4-6, a (n=3 per tots els punts analitzats). Valors representats com la mitja \pm SEM.

3.2.1.2. Estudi de l'estabilitat del vector AAVrh10 a sistema nerviós perifèric

Els ratolins injectats amb AAVrh10GFP es van eutanasiar per punció intracardíaca, i mitjançant infusió de paraformaldehid al 4% es van fixar els teixits abans de l'extracció de les mostres. De cada animal es van extreure mostres de DRG i ME de les regions lumbar (L1-3; L4-6), toràciques (T 1-12) i cervicals (C1-7).

Com que el vector viral administrat codificava per la proteïna verda fluorescent, es van comptabilitzar les cèl·lules verdes de 7-8 seccions de 10 μ m de DRG i 20 μ m de ME de cada

regió. A DRG els valors obtinguts es representen en percentatges de cèl·lules GFP positives respecte el nombre promig de neurones per DRG (Figura 26A), i per ME es representen respecte el nombre de neurones ChAT positives per secció de ME (Figura 26B).

A DRG el marcatge GFP+ es localitzava tant als ganglis de la regió lumbar com toràcica i cervical. Aquest presentaven uns nivells de transducció elevats des de setmana 1 post-injecció, i es van mantenir fins a setmana 6. Comparant els nivells d'expressió de GFP entre els temps analitzats es va observar una lleugera disminució del percentatge de cèl·lules GFP+ a setmana 10 que estaria al voltant de la meitat respecte a les setmanes 1, 3 i 6 ($\$p<0,01$; $*p<0,05$).

En canvi, a ME els nivells de transducció són semblants en els diferents temps analitzats amb percentatges de transducció més elevats a les regions pròximes al lloc d'injecció (lumbar i toràcica) i nivells més baixos a la regió cervical, més allunyada del lloc d'injecció.

3.2.2. Estudi de la presència d'anticossos neutralitzants contra AAV1 i AAVrh10 a sèrum de ratolins

Tot i la baixa capacitat immunogènica dels AAVs comparat amb els Ads, s'ha descrit que AAV1 és capaç d'infectar cèl·lules dendrítiques i generar una resposta humoral (Petry *et al.*, 2008), tanmateix per AAVrh10 no s'han fet estudis de cap tipus.

Les cèl·lules dendrítiques, un cop infectades, actuaran com a cèl·lules presentadores d'antigen induint una resposta immune contra el virus i generant entre d'altres efectes, la producció d'anticossos neutralitzants, que impediran la readministració del virus. Els anticossos neutralitzants generalment s'uneixen a la càpside del virus, evitant la unió d'aquest amb receptor cel·lular i l'entrada dins la cèl·lula hoste. La presència d'anticossos neutralitzants contra la càpside pot arribar a emascarar la veritable capacitat infectiva del virus. L'estructura proteica de la càpside determina l'activació de la resposta immune, doncs regions determinades de la càpside interaccionen amb receptors específics de la cèl·lula hoste (Vandenberghe *et al.*, 2006).

Es va dur a terme l'avaluació de la presència d'anticossos neutralitzants pels dos vectors virals a sèrum dels ratolins injectats via intratecal. Es van injectar ratolins ICR adults amb 1.10^{11} partícules virals per animal en un volum final $10\mu\text{l}$ per cada vector. Tres setmanes després de l'administració del vector es van obtenir sèrums de ratolins immunitzats per cadascun dels vectors.

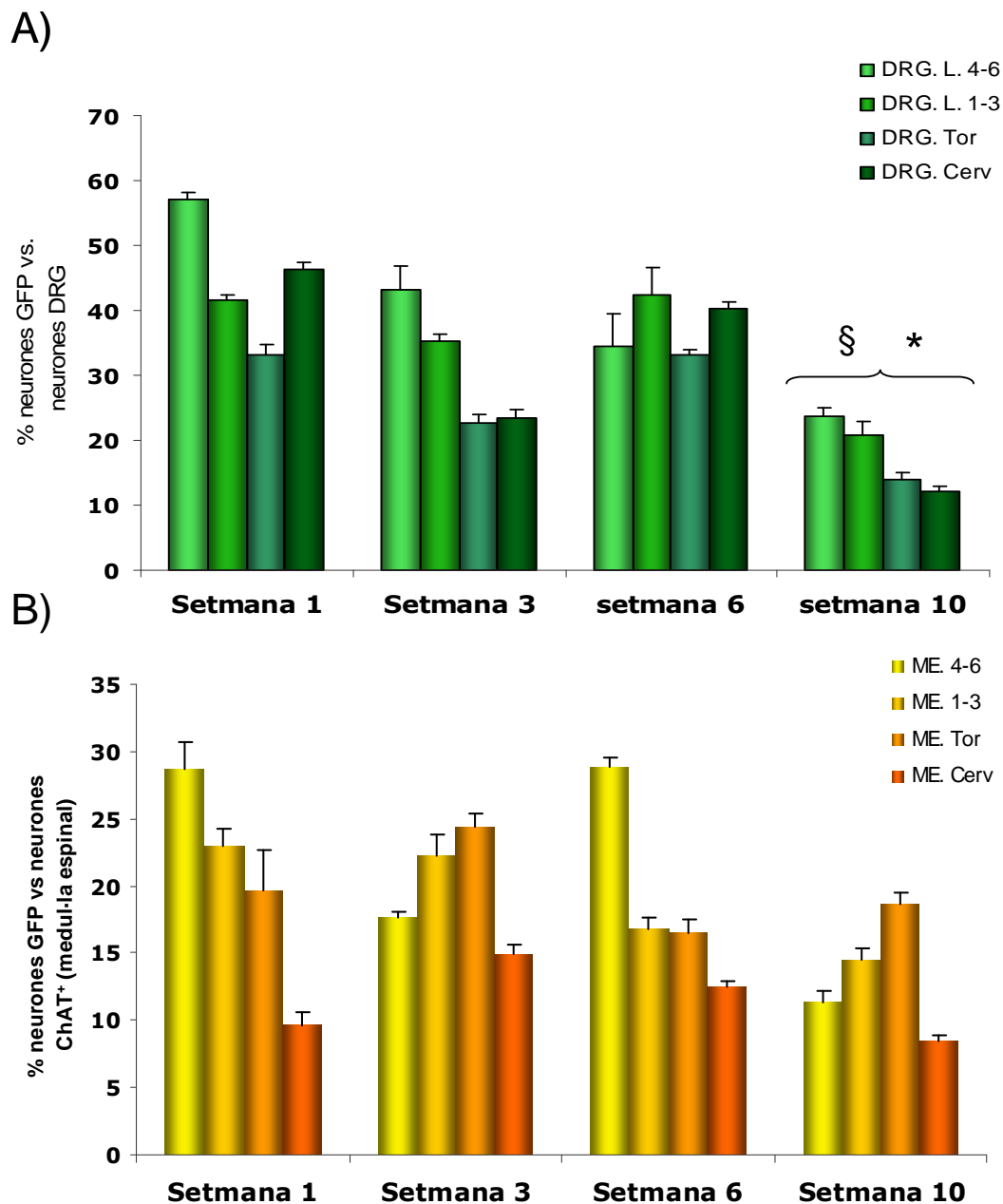


Figura 26: Estudi de l'estabilitat *in vivo* de AAVrh10GFP injectat intratecal. A) representació del percentatge de neurones GFP positives per gangli a les diferents regions de DRG, a diferents temps analitzats. **B)** Representació del percentatge de neurones GFP positives per secció de ME respecte al nombre de neurones ChAT positives. Els valors es representen com la mitja±SEM. Anàlisi estadística mitjançant test de comparació múltiple Newman-Keuls (§ $p < 0,01$ respecte setmana 1; * $p < 0,05$ respecte setmana 3 i 6).

Mitjançant estudis *in vitro* es va quantificar la capacitat infectiva d'AAV1GFP i AAVrh10GFP, a una MOI de 1, en presència dels sèrums de ratolins immunitzats per cada virus. Els sèrums es van utilitzar concentrats o diluïts 1/50, 1/100 i 1/200 vegades. Setanta dues hores post infecció es van comptabilitzar el nombre de cèl·lules GFP+. Els valors obtinguts es van

representar com a percentatge d'inhibició dels nivells d'expressió de GFP, de cada vector utilitzant com a controls positius els sèrums de ratolins no injectats (Figura 27). Els estudis es van realitzar per duplicat en tres experiments independents.

Tres setmanes després de l'administració intratecal d'AAVs vam poder observar la presència d'anticossos neutralitzants contra la càpside d'aquests vectors tant per AAV1 com per AAVrh10 (sèrum concentrat). Tanmateix, la quantitat d'anticossos neutralitzants era molt superior amb AAV1, doncs el percentatge d'inhibició del transgen d'AAV1 es mantenia al 100% tot i diluint el sèrum 200 vegades. Al contrari, el nombre d'anticossos neutralitzants generats en resposta a l'administració d'AAVrh10 era considerablement menor, ja que amb una dilució 1/50 ja s'aconseguia el 100% d'infecció.

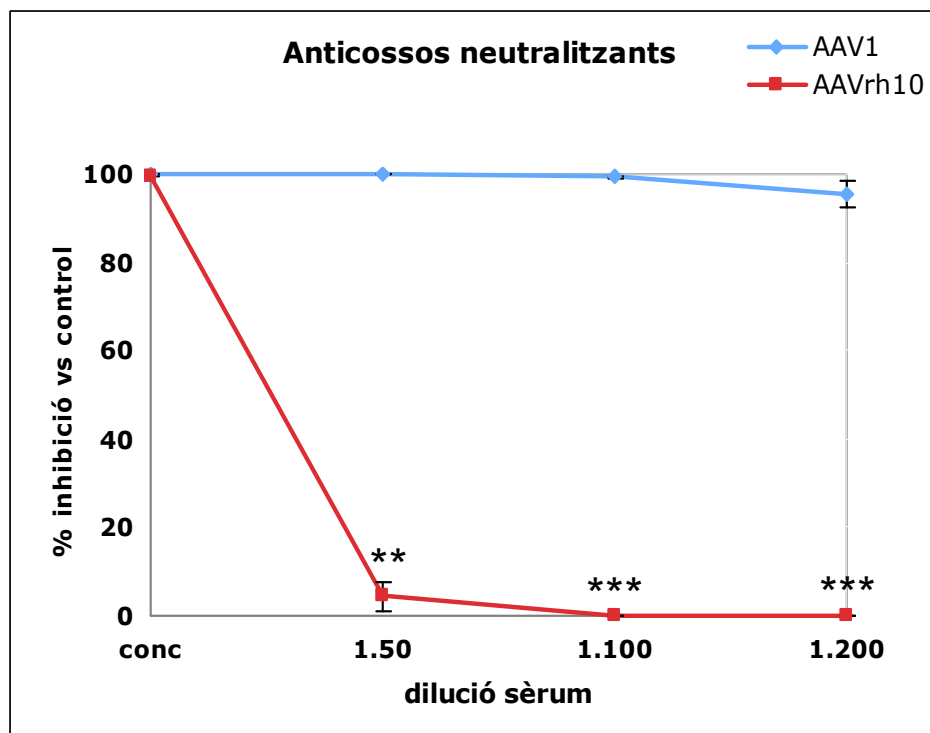


Figura 27: Anàlisi de la presència d'anticossos neutralitzants a sèrum de ratolí injectat amb AAVs intratecalment. Representació del percentatge d'inhibició de l'expressió de la proteïna verda fluorescent GFP en presència de sèrum immunitzat. Anàlisi estadística mitjançant el test t Student. Els valors es representen com la mitja±SEM, n=3 ratolins per punt, (**p<0,01 i ***p<0,001).

Tanmateix, tot i la resposta humoral contra la càpside dels dos serotips d'AAV, no es va observar infiltració limfocitària en seccions histològiques de DRG d'AAV1 ni de DRG i ME d'AAVrh10, suggerint que no hi havia resposta cel·lular.

3.2.3. Estudi comparatiu de l'eficiència de transducció i estabilitat del vector AAVrh10 ss vs. AAVrh10sc

Els virus Adeno-associats de cadena senzilla ssDNA presenten un pas limitant durant el procés d'infecció i expressió del transgen dins la cèl·lula diana. Quan infecten la cèl·lula, aquests vectors requereixen de la maquinària cel·lular per poder sintetitzar la cadena complementària del ssDNA i així poder expressar el transgen. Aquest pas és crític perquè el genoma viral s'exposa a l'actuació de les DNases cel·lulars, que poden degradar el DNA viral. Per aquest fet, la utilització de vectors Adeno-associats de doble cadena facilita el pas d'expressió del genoma viral, augmentant així, els seus nivells d'expressió (McCarty *et al.*, 2003). Aquests virus s'anomenen virus Adeno-associats de cadena complementària (scAAV).

Malauradament, el genoma viral dels vectors scAAV tenen una capacitat reduïda ja que es veu disminuïda a la meitat (2,3kb), respecte el genoma viral de ssAAV (4,7kb), ja de per si força reduïda comparant amb altres vectors virals. Aquest fet, limita la utilització d'aquests vectors a gens terapèutics de mida petita.

Un cop conegut el tropisme neuronal específic del serotip AAVrh10, vam realitzar estudis comparatius dels nivells d'expressió del transgen, entre un vector adeno-associat que contenia un genoma viral de cadena senzilla (ssAAV) i un AAV amb el genoma viral de cadena complementària (scAAV).

Com ja estava descrit l'avantatge dels AAVsc vs. ss (McCarty *et al.*, 2003), vam voler comparar si regions reguladores del transgen, permetrien nivells de transducció més elevats en els AAVss, igualant o superant la capacitat d'expressar-se abans i a nivells superiors dels AAVsc.

Així, el ssAAV codificava per un promotor CAG (1,6 kb), promotor d'expressió forta i per la seqüència WPRE (700bp), seqüència reguladora que estabilitza el mRNA i del transgen GFP (800pb). Per altre banda, el scAAV codificava pel promotor ubicu CMV (700bp) i el transgen GFP (800 bp) (Figura 28).

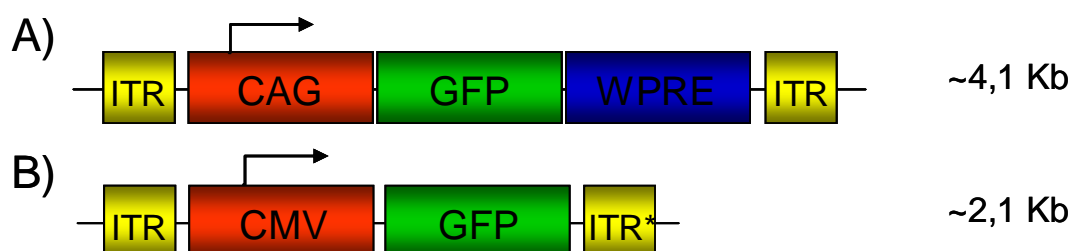


Figura 28: Esquema dels genomes virals d'AAV: **A)** AAVss; **B)** AAVsc; ITR* mutada

Per comparar els nivells de transducció del transgen de cada genoma viral, a sistema nerviós perifèric, es van injectar ratolins ICR adults amb 1.10^{10} partícules virals per ratolí, via intratecal. Es van eutanasiar a 1 i 6 setmanes després de l'administració del vector i es va quantificar l'estabilitat dels genomes virals mitjançant PCR quantitativa (qPCR).

Els animals van ser eutanasiats per decapitació i es van extreure mostres de DRG i ME de les diferents regions, lumbar, toràcica i cervical. De cada mostra obtinguda es va quantificar per qPCR la quantitat de DNA de GFP de cada genoma viral (vg), i es van representar els vg per cèl·lula, calculat en funció de les dades obtingudes pel gen endogen de la ciclofilina B.

Tant a nivell de DRG com de ME vam obtenir un nombre semblant de vg/cèl·lula amb els dos genomes virals, als diferents temps analitzats (Figura 29A i B). Principalment s'observen diferències a setmana 1 post-injecció, sobretot a ME (** $p < 0,01$) (Figura 29B). A setmana 6 post-injecció augmenta lleugerament el nombre de vg/cèl·lula amb el ss, però no s'observen diferències significatives amb sc, ni a DRG ni a ME.

3.2.3.1. Quantificació de la presència de genomes virals a líquid cefaloraquidi després de l'administració intratecal

El LCR es produeix majoritàriament en els plexes coroideus i s'absorbeix a les microvellositats aracnoides cerebrals i espinals, amb una taxa de recanvi de 0,25 ml/min en humans. Els virus injectats a LCR que no entren a les cèl·lules de sistema nerviós poden mantenir-se al LCR o ser eliminades per cèl·lules del sistema immunològic.

Vam estudiar la presència del virus a líquid cefaloraquidi als diferents temps analitzats post injecció. Es van realitzar extraccions de LCR a través de punció a cisterna magna, a ratolins injectats amb els vectors AAV2/rh10ss i AAV2/rh10sc, 1, 3 i 6 setmanes després de l'administració.

Es van comptar el nombre de cèl·lules GFP+ per cada regió de sistema nerviós perifèric i no es van veure diferències significatives (dades no mostrades).

Seguint el protocol descrit per (Segura *et al.*, 2009) i adaptat per la quantificació de vectors Adeno-associats, es va quantificar per qPCR els genomes virals presents a LCR després de la injecció intratecal (Taula 1).

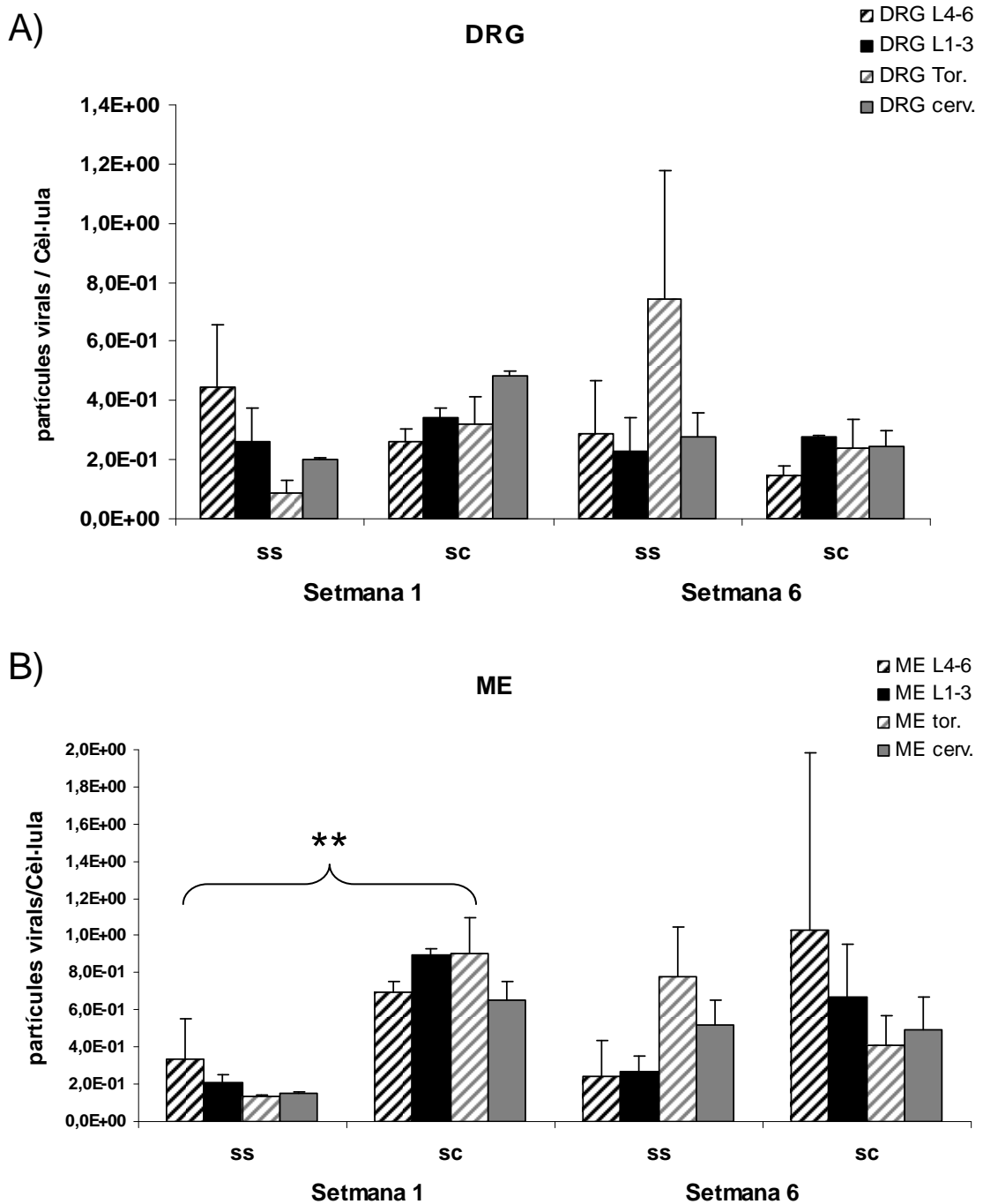


Figura 29: Quantificació del DNA de GFP contingut en les vectors ssAAVrh10 i scAAVrh10 a setmana 1 i 6, després de l'administració del vector viral, en les diferents regions de sistema nerviós perifèric. A) Quantificació mitjançant qPCR del DNA de GFP vs. Ciclofilina B a DRG (n=2 per regió de DRG i temps analitzat). B) Quantificació mitjançant qPCR del DNA de GFP vs. Ciclofilina B a ME (n=2 per regió de DRG i temps analitzat). Els valors s'expressen com la mitja±SEM (p<0,01). Anàlisi estadística mitjançant el test de comparació múltiple Newman-Keuls.**

Es van obtenir al voltant de 10^4 còpies/ml de genomes virals a LCR als diferents temps analitzats. Es va observar una lleugera disminució en el nombre de còpies de virus/ml amb el temps, encara que les diferències no van ser significatives entre AAVrh10ss i AAVrh10sc.

VIRUS	Setmana post-injecció	LCR ratolí (còpies/ml)	Error std
AAVrh10sc	1 (n=3)	6,9E+04	1,2E+04
	3 (n=5)	4,2E+04	2,9E+03
	6 (n=4)	4,1E+04	1,5E+03
AAVrh10ss	1 (n=3)	8,6E+04	1,5E+04
	3 (n=2)	7,0E+04	2,2E+03
	6 (n=2)	6,0E+04	3,0E+04

Taula 1: Quantificació del nombre de genomes virals a LCR de ratolins injectats amb ssAAVrh10GFP i scAAVrh10GFP mitjançant qPCR. Temps analitzats setmana 1, 3 i 6 post-injecció. Els valors s'expressen com la mitja±SEM. Anàlisi estadística amb el test de comparació múltiple Newman-Keuls.

Tenint en compte que el volum de LCR per ratolí és de 40µl i que es van administrar 1.10^{10} partícules virals per ratolí, podem observar que el nombre de partícules virals una setmana després de la injecció disminueix uns 6 logaritmes respecte la concentració inicial. Malauradament la sensibilitat dels assajos *in vitro* no va permetre determinar si aquests vg corresponien a virus infecciosos.

PART II: TERÀPIA GÈNICA PER NEUROPATIA DIABÈTICA UTILIZANT AAVs QUE CODIFIQUEN PER IGF-I

La polineuropatia perifèrica presenta afectació tant a nervis somàtics com a nervis autònoms i és una de les majors complicacions de la diabetis mellitus. Les característiques patològiques de la polineuropatia diabètica en humans són degeneració axonal, pèrdua de fibres nervioses, desmielinització i remielinització segmentades (Dyck *et al.*, 1999). Desafortunadament, els models animals per neuropatia diabètica presenten alteracions nervioses, que generalment es limiten a dèficits neurofisiològics relativament lleugers i a canvis morfomètrics sense grans anomalies (Wright and Nukada, 1994; Hounsom and Tomlinson, 1997; Sima and Sugimoto, 1999), degut possiblement a que els ratolins diabètics no viuen prou temps i per tant, el desenvolupament de les complicacions de la diabetis, no és comparable als humans. Per aquest motiu vam combinar la diabetis experimental induïda amb STZ juntament amb la lesió del nervi perifèric, doncs s'ha demostrat que els animals diabètics tenen una capacitat regenerativa significativament menor (Kennedy and Zochodne, 2000).

1. Teràpia gènica per neuropatia diabètica mitjançant AAV1IGF-I

1.1. Construcció de genomes virals amb el factor de creixement IGF-I

A partir dels plàsmids *pAAV-CAG-PLK-WPRE* i *pGG2-IGF-I*, es va generar el genoma viral *pAAVCAG-IGF-I-WPRE* per digestió *XhoI* / *NotI* (Figura 30).

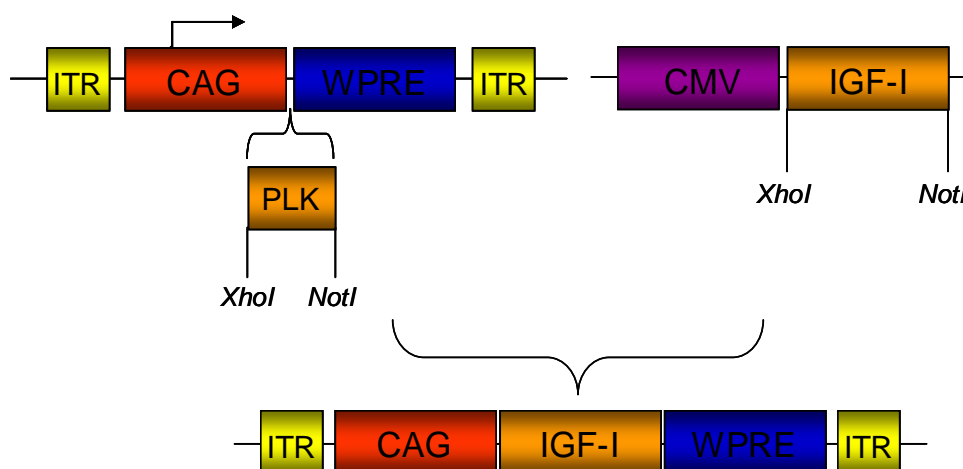


Figura 30: Construcció del plàsmid *pAAVCAGIGF-I-WPRE*.
 CAG: promotor de la β -Actina de pollastre amb l'enhancer de CMV; WPRE: seqüència estabilitzadora del mRNA.

1.2. Disseny experimental

Generat el vector viral AAV1-CAG-IGF-I-WPRE, es va procedir a la utilització d'aquest vector per l'estudi de teràpia gènica, en un model murí per neuropatia diabètica.

El disseny experimental d'aquest estudi consistia en induir diabetis experimental a un grup de ratolins ICR mascles de 8 setmanes d'edat. Els animals van ser injectats intraperitonealment, un cop al dia durant cinc dies consecutius, a una dosi de STZ de 45 mg/kg. Es va dur a terme un seguiment del pes corporal i dels nivells de glucosa en sang dels animals, que es realitzava sempre a primera hora del matí. No es van observar diferències en el pes ni en les glucèmies entre els animals control i tractats amb AAV1 al llarg de l'estudi. Un mes després de la inducció de la diabetis tots els animals van desenvolupar hiperglucèmia, arribant a valors de glucosa en sang entre 500 i 600 mg/dl (Figura 31). Transcorregut un mes des de la inducció de la diabetis els animals entraven a formar part de l'estudi, es dividien en dos grup, els ICR diabètics (db) control i els ICR diabètics tractats. Els ICR db controls van ser injectats amb $8.3 \cdot 10^{10}$ vg del vector viral AAV1CAG-GFP-WPRE i els ICR db tractats van ser injectats amb la mateixa quantitat del vector viral AAV1-CAG-IGF-I-WPRE. A més, els animals van ser sotmesos una lesió quirúrgica o aixafament del nervi ciàtic anomenada *crush*, a una de les potes.

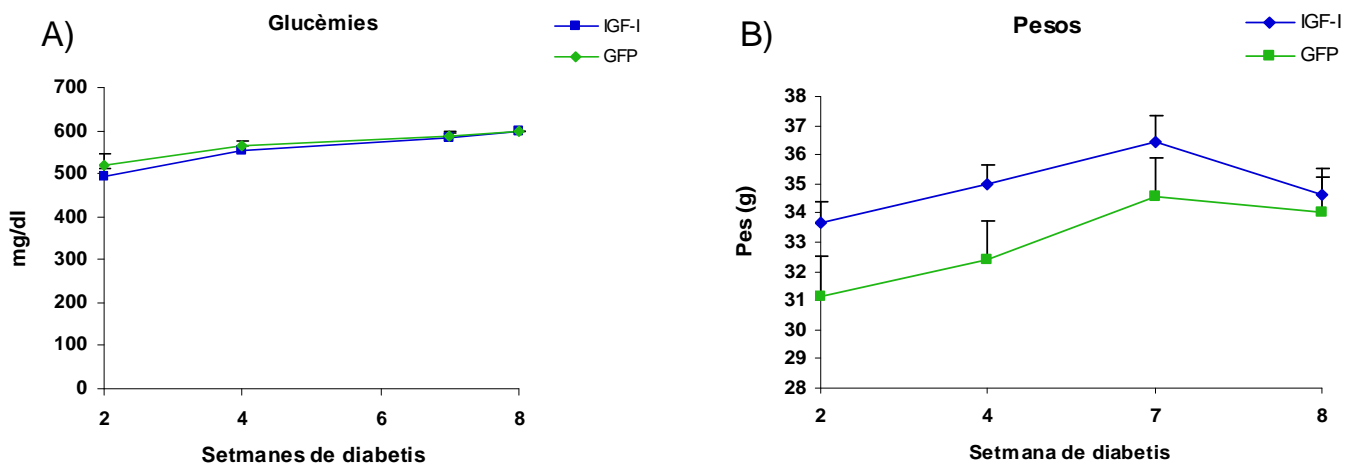


Figura 31: **A)** Representació de la concentració de glucosa en sang (mg/dl) 2, 4, 7 i 8 setmanes després de la inducció de la diabetis amb STZ, en controls (GFP) i tractats (IGF-I). **B)** Pesos obtinguts (g) dels animals controls i tractats al llarg de l'estudi.

Tres setmanes després de l'administració intratecal del virus i de la lesió a una de les potes, els animals van ser sotmesos a proves electrofisiològiques per avaluar canvis en la velocitat de conducció nerviosa en les potes intactes, i per avaluar la capacitat de regeneració nerviosa en les potes lesionades, en condicions de diabetis. Una setmana més tard, és a dir, quatre setmanes

després de l'administració del virus i 8 setmanes després de la inducció de la diabetis, els animals van ser sotmesos de nou a estudis electrofisiològics, i seguidament van ser eutanasiats i es va procedir a l'extracció de mostres per realitzar els estudis pertinents (Figura 32).

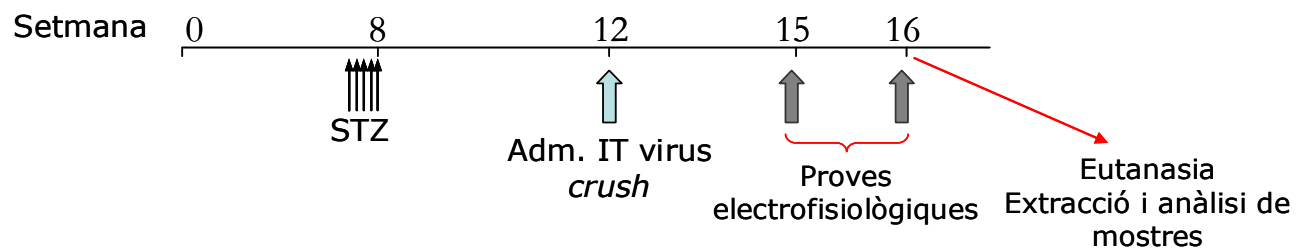


Figura 32 : Esquema del disseny experimental seguit en l'estudi de teràpia gènica per neuropatia diabètica mitjançant AAV1.

1.3. Estudi de l'eficiència de transducció d'AAV1IGF-I a sistema nerviós perifèric en un model murí per neuropatia diabètica

Es van extreure mostres de ganglis de l'arrel dorsal (DRG L 4-6) de la regió lumbar, nervi ciàtic i nervi tibial de la pota intacte i la pota lesionada. De cada grup d'animals, controls i tractats, es van distribuir les mostres extretes en mostres de la pota intacte, que eren les mostres pròximes al nervi ciàtic no lesionat, i en mostres de la pota lesionada, que eren les mostres pròximes al nervi ciàtic lesionat. Les mostres de la pota intacte ens permetien estudiar l'evolució de la neuropatia diabètica, per altre banda, a partir de les mostres de la pota lesionada es va analitzar la capacitat de regeneració nerviosa, en un model murí per neuropatia diabètica, injectat via intratecal AAV1GFP o AAV1IGF-I.

1.3.1. Quantificació de l'expressió d'IGF-I als animals transduïts

Els estudis de quantificació de l'expressió d'IGF-I es van realitzar en potes intactes dels animals tractats i controls.

Es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica d'IGF-I, en els DRG del grup d'animals tractats comparant-los amb el grup control (Figura 33A i 33B). Es van captar les imatges per microscòpia confocal de forma seqüencial. Inicialment es van fixar els ajustaments pel làser 568 (color vermell) i es va captar la foto del DRG control i seguidament del DRG tractat. Aquest sistema ens permet comparar els nivells d'expressió d'IGF-I per immunohistoquímica. Els

ajustaments pel làser 405 (color blau) no es van fixar, doncs en aquest estudi no es comparaven les imatges captades per aquest làser.

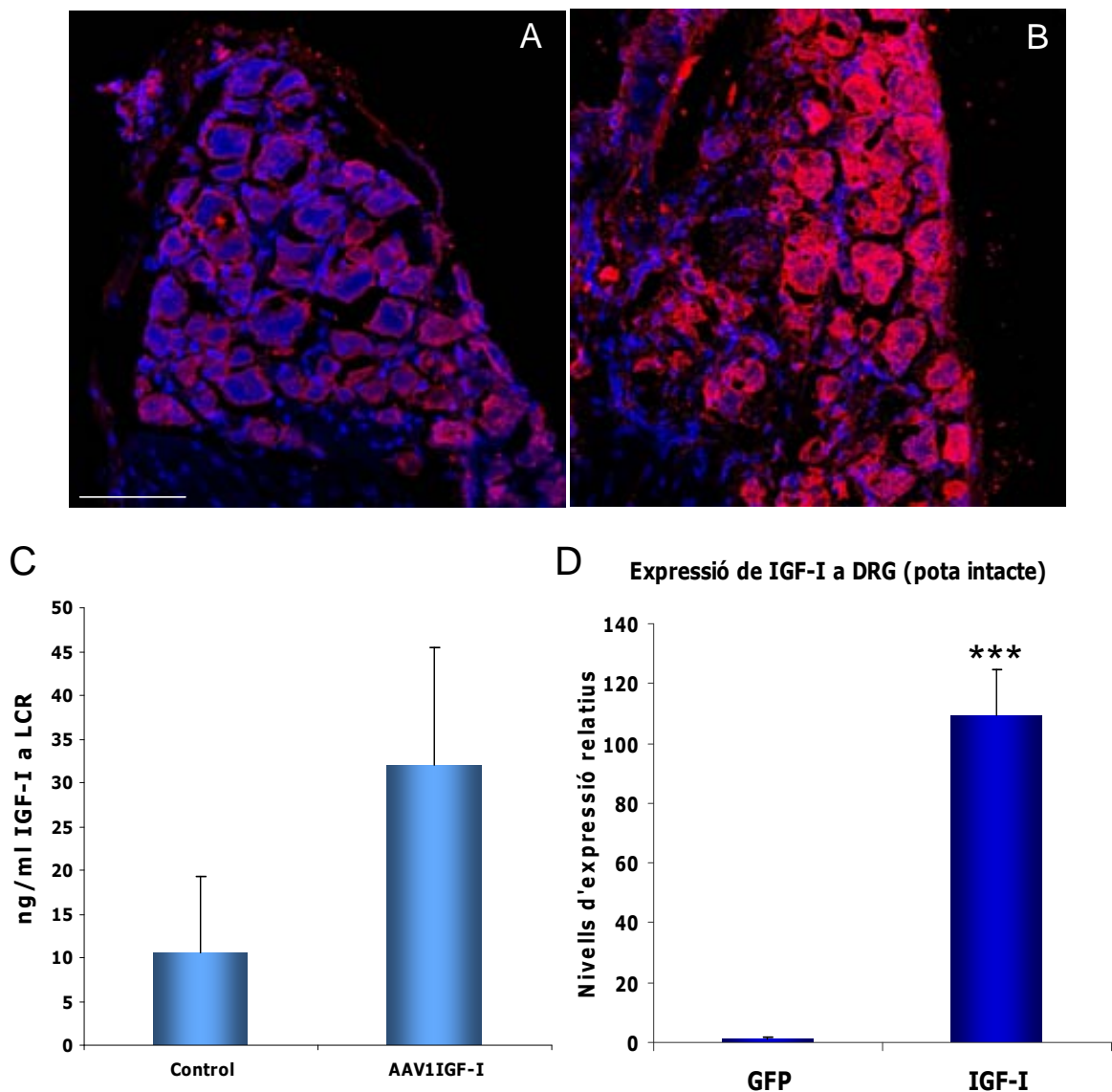


Figura 33: Estudi dels nivells d'expressió d'IGF-I un mes després de la injecció intratecal dels vectors virals AAV1GFP i AAV1IGF-I. **A)** Talls histològics de DRG d'animals control (**A**) i tractats (**B**), van ser incubats amb l'anticòs contra IGF-I (vermell) i amb el marcador de nuclis hoechst (blau) (----160µm). **C)** Quantificació dels nivells d'IGF-I a líquid cefaloraquídi de ratolins control (n=2) i tractats (n=3) (ng/ml). **D)** Representació dels nivells d'expressió relatius de mRNA d'IGF-I a DRG mitjançant qPCR. Nivells d'IGF-I a DRG de la pota intacte, (n=4 pels control i n=7 pels tractats). Els resultats es representen com la mitja±SEM (***)p<0,001).

Els nivells del transgen presents a líquid cefaloraquídi, tant al grup control com al tractat, es van mesurar per ELISA. Es va evidenciar un augment d'unes tres vegades els nivells d'IGF-I en el LCR dels animals injectats amb el vector AAV1IGF-I (Figura 33C), encara que les diferències observades entre els injectats amb AAV1GFP i AAV1IGF-I no eren significativament diferents.

A partir d'extractes de RNA de DRG es va quantificar per PCR quantitativa els nivells d'expressió del mRNA d'IGF-I (Figura 33D). S'observà un increment de més de cent vegades pels nivells de RNA d'IGF-I en DRG de la pota intacte dels animals del grup tractat respecte als del grup control (** $p < 0,001$). Els valors obtinguts es representen en nivells d'expressió relatius de mRNA d'IGF-I, normalitzats amb el mRNA del gen ribosòmic 36B4. Els resultats de l'estudi comparatiu entre controls i tractats es representen com a valors de la mitja \pm SEM, i es realitzà un anàlisi estadística mitjançant el test t Student.

1.3.2. Determinació molecular de la capacitat regenerativa d'IGF-I en neuropatia diabètica

Inicialment es van quantificar els nivells d'expressió del mRNA d'IGF-I a ganglis de la pota lesionada, a partir d'extractes de RNA de DRG. Es va observar un augment de prop de quaranta vegades els nivells d'IGF-I en DRG dels animals del grup tractat respecte als del grup control (Figura 34) (** $p < 0,001$).

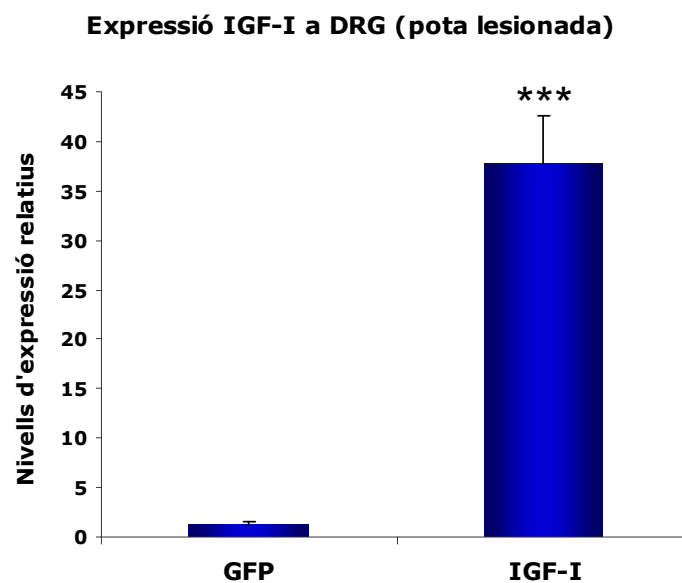


Figura 34: Estudi dels nivells d'expressió d'IGF-I un mes després de la injecció intratecal dels vectors virals AAV1GFP i AAV1IGF-I, a la pota lesionada. Nivells d'IGF-I a DRG (n=4 pels controls i n=5 pels tractats). Els resultats es representen com la mitja \pm SEM (** $p < 0,001$).

Quan es produeix lesió a nervi perifèric es succeeixen un seguit de canvis estructurals i funcionals a les cèl·lules afectades. Les fibres nervioses lesionades quan inicien el procés de regeneració augmenten els nivells d'expressió de diferents proteïnes, entre elles destacaríem GAP 43. Aquesta proteïna s'expressa principalment al conus de regeneració i inicia el procés de regeneració de la fibra nerviosa lesionada (Van Lookeren Campagne *et al.*, 1989).

Està descrit que la capacitat de regeneració nerviosa està disminuïda en el model de neuropatia diabètica. Per veure si IGF-I millora aquesta funció es van analitzar els nivells d'expressió de mRNA de GAP43 a ganglis de l'arrel dorsal de la pota lesionada, en ambdós grups d'animals. Es van comparar els nivells de mRNA de GAP 43 i es va observar un augment de 2,5 vegades els nivells d'expressió de RNA de GAP43 en DRG de ratolins tractats respecte els controls (**p<0,001) (Figura 35A).

Vam mesurar també els nivells de la proteïna de GAP43 mitjançant western-blot, a partir d'extractes proteics de DRG d'animals controls i animals tractats (Figura 35B). En els DRG tractats vam trobar un increment significatiu en la seva expressió de 1,5 vegades respecte als animals control (*p<0,05) (Figura 35C). L'augment significatiu dels nivells de la proteïna GAP43 indicaven un efecte positiu d'IGF-I en la capacitat de regeneració en condicions de diabetis.

Les cèl·lules de Schwann juguen un paper clau en el correcte desenvolupament de la regeneració nerviosa; els efectes d'IGF-I sobre les SC han estat estudiats, i se sap que promou la supervivència, motilitat, proliferació i mielinització de les SC. Per altra banda, la diabetis alenteix la regeneració nerviosa quan hi ha lesió a SNP, i en conseqüència hi ha una disminució dels nivells d'expressió de gens mielinitzants (Ariza, 2010).

Per determinar l'impacte d'IGF-I sobre els nivells d'expressió de gens mielinitzants, es van realitzar qPCR d'extractes de RNA de nervi ciàtic. Així, vam analitzar els nivells d'expressió dels gens mielinitzants P0, PMP22 i MAG, en les potes lesionades.

Es va obtenir un augment de l'expressió dels gens mielinitzants en les potes lesionades dels ratolins tractats (IGF-I) respecte els controls (GFP), encara que no vam trobar diferències significatives, probablement degut a una elevada variabilitat (Figura 36A).

Mitjançant western-blot vam analitzar els nivells de la proteïna P0, que equival al 50% de les proteïnes de la mielina, a nervi ciàtic lesionat (Figura 36B). Vam observar un augment significatiu dels nivells de la proteïna P0 en els animals tractats, 3 vegades superior als nivells detectats per P0 en els animals controls (*p<0,05) (Figura 36C).

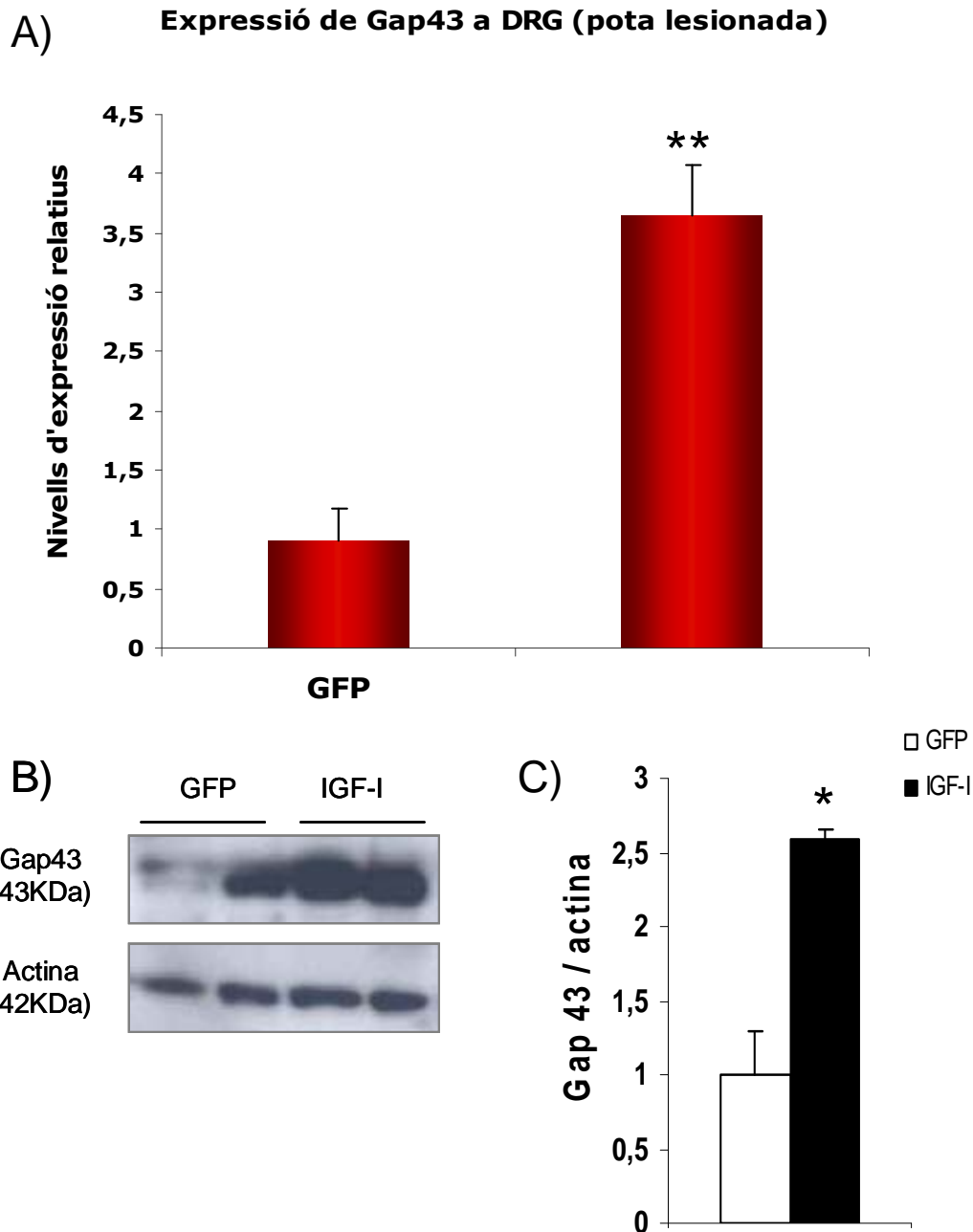


Figura 35: Estudis dels nivells d'expressió de la proteïna GAP43 a DRG de la pota lesionada, un mes després de la lesió a nervi ciàtic i de la injecció intratecal dels vectors virals AAV1GFP i AAV1IGF-I. **A)** Quantificació dels nivells d'expressió de mRNA de GAP43 mitjançant qPCR, (n=3 pels control i n=7 pels tractats). Nivells d'expressió relatius representats com a valors de la mitja±SEM (**p<0,001). **B)** Immunodetecció de la proteïna GAP43 a partir d'extractes proteïcs de DRG d'animals control i tractats. **C)** Quantificació mitjançant densitometria de les bandes dels resultats obtinguts per WB. Els resultats es representen com a la mitja±SEM (*p<0,05), (n=2 per controls i tractats) i s'expressen com a nivells relatius de proteïna de GAP43/Actina.

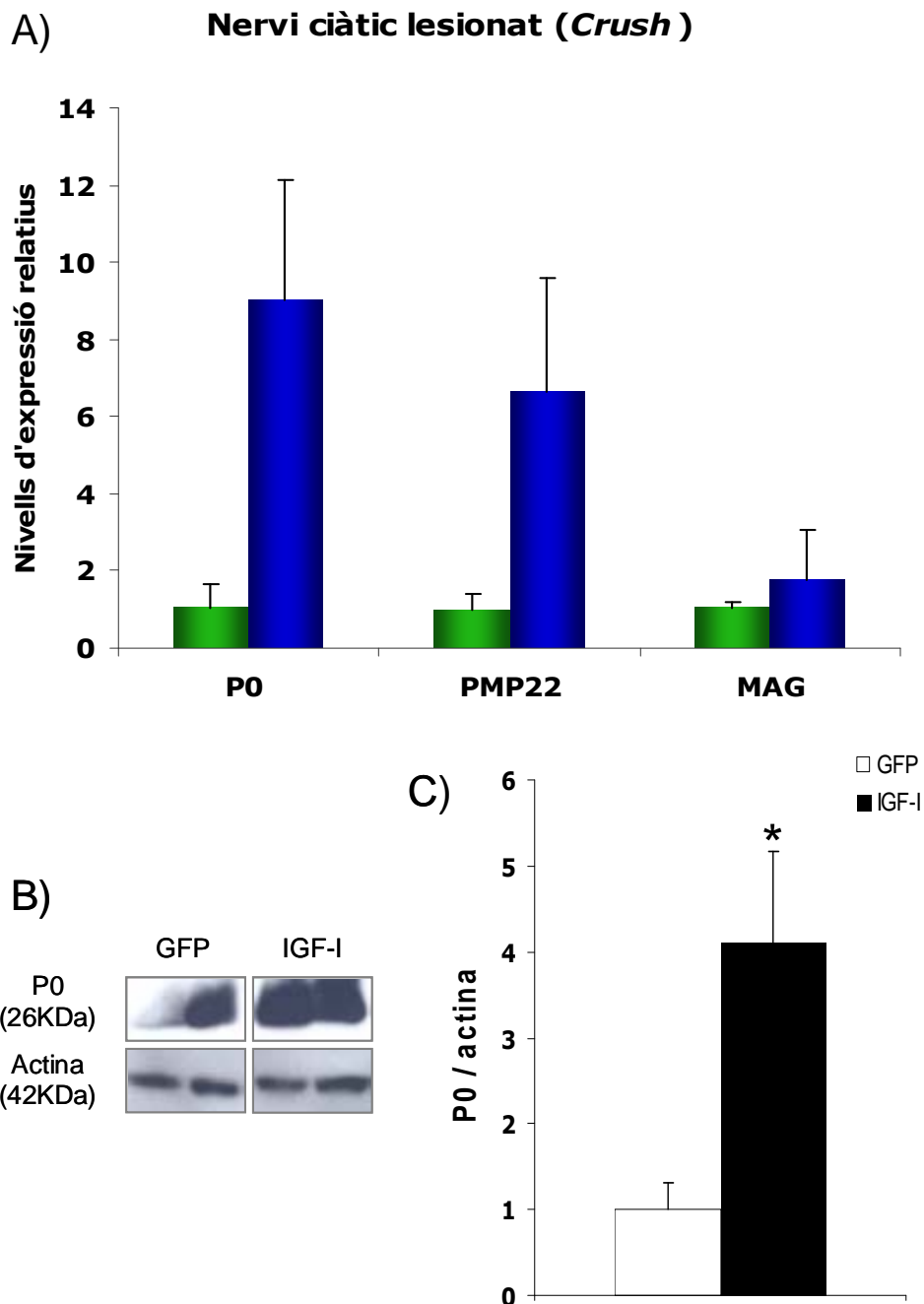


Figura 36: Estudis dels nivells d'expressió de les proteïnes de la mielina, P0, PMP22 i MAG a nervi ciàtic lesionat, un mes després de la injecció intratecal dels vectors virals AAV1GFP i AAV1IGF-I. A) Quantificació dels nivells d'expressió de mRNA de P0, PMP22 i MAG mitjançant qPCR. Nivells d'expressió relatius representats com a valors de la mitja±SEM (P0: n=4 ; PMP22: n=5; MAG: n=5 tractats; n=3 controls). **B)** Immunodetecció de la proteïna P0 a partir d'extractes proteics de nervi ciàtic lesionat d'animals control i tractats. **C)** Quantificació mitjançant densitometria de les bandes dels resultats obtinguts per WB (n=2 pels controls i n=2 pels tractats). Els resultats es representen com la mitja±SEM i s'expressen com a nivells relatius de proteïna de P0/Actina (*p<0,05).

1.3.3. Estudis neurofisiològics dels animals injectats amb el vector AAV1IGF-I

Els tests electrofisiològics i les anàlisis morfomètriques es van realitzar en col·laboració amb el Dr. Xavier Navarro, del Grup de Neuroplasticitat i Regeneració, de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.3.3.1 Avaluació de la velocitat de conducció nerviosa a nervi intacte

Els resultats dels tests electrofisiològics, realitzats en les potes intactes dels ratolins control (AAV1GFP) i els ratolins tractats (AAV1IGF-I) es mostren a la taula 2. Es van analitzar a setmana 3 i 4 després de l'administració del vector (AAV1GFP i AAV1IGF-I), ó 7 i 8 setmanes de diabetis induïda, respectivament. En condicions d'hiperglucèmia, tant el ratolins control com els tractats, presenten alteracions electorfisiològiques a nivell de conducció nerviosa motora (MNCV) i sensorial (SNCV) (Homs J *et al.*) (Annex II). Quan es comparaven els resultats obtinguts pels ratolins tractats amb IGF-I respecte els ratolins control (GFP), es van observar millores significatives a nivell de velocitat de conducció nerviosa sensorial del segment distal SNCVd (^ap<0,05). Respecte als altres paràmetres analitzats, no es van observar canvis significatius.

<i>Paràmetre</i>	<i>Tractament</i>		<i>Tractament</i>	
	AAV1-GFP (n=10)		AAV1-IGF1 (n=21)	
Setmana p.i.	3	4	3	4
<i>Múscul plantar</i>				
CMAP (mV)	6.8 ± 0.4	6.3 ± 0.4	6.4 ± 0.3	6.3 ± 0.5
MNCV (m/s)	33.1 ± 0.8	34.1 ± 1.1	38.8 ± 1.8	36.5 ± 0.6
<i>Nervi digital</i>				
CNAP (µV)	31.9 ± 3.5	26.6 ± 2.2	32.2 ± 2.3	33.5 ± 2.7
SNCVp (m/s)	36.9 ± 1.9	36.8 ± 1.8	39.9 ± 1.1	37.2 ± 1.0
SNCVd (m/s)	29.1 ± 0.7	24.2 ± 0.8	32.0 ± 0.6 ^a	28.7 ± 0.6 ^a

Taula 2: Resultats dels tests d'electrofisiologia realitzats a les potes intactes dels ratolins diabètics, controls i tractats, injectats amb els vectors virals AAV1GFP i AAV1 IGF-I, respectivament. Els tests es realitzen a tres i quatre setmanes després de l'administració intratecal del vector. p<0.05 versus ^a AAV1-GFP, al mateix temps de seguiment. Anàlisi estadística ANOVA amb realitzat mitjançant tests posthoc Bonferroni. Resultats expressats com a mitjana ± SEM. CMAP: Potencial d'acció compost a múscul; CNAP: Potencial d'acció compost a nervi; MNCV: velocitat de conducció nerviosa motora; SNCV: velocitat de conducció nerviosa sensorial; -p: segment proximal del nervi; -d: segment distal del nervi. Totes les amplituds CMAP i CNAP s'obtenen a partir de l'estimulació de l'escotadura ciàtica.

1.3.3.2 Avaluació de la capacitat de regeneració nerviosa a nervi lesionat

Es van realitzar tests electrofisiològics a les potes lesionades amb la finalitat d'avaluar la capacitat de regeneració dels nervis perifèrics, quan s'administra el factor neurotròfic IGF-I. Es van analitzar dos temps, a dia 24 i 31 després de la lesió. En cap dels dos temps es van observar canvis significatius ni en la velocitat de conducció nerviosa sensorial ni motora entre els dos grups (Taula 3).

<i>Tractament</i> <i>Paràmetre</i>	AAV1-GFP (n=9)		AAV1-IGF1 (n=21)	
	24	31	24	31
Dies post-lesió				
<i>m. tibialis ant.</i>				
CMAP (mV)	12.5 ± 1.5	18.2 ± 1.8	12.6 ± 1.0	21.2 ± 1.1
<i>Múscul plantar</i>				
CMAP (mV)	0.54 ± 0.17	1.29 ± 0.34	0.41 ± 0.05	1.24 ± 0.21
MNCV (m/s)	11.3 ± 1.2	15.4 ± 0.8	11.3 ± 1.0	17.1 ± 1.1
<i>Nervi digital</i>				
CNAP (µV)	0.78 ± 0.44	3.43 ± 1.34	0.52 ± 0.29	3.10 ± 0.76
SNCVp (m/s)	15.3 ± 3.9	15.5 ± 1.0	16.4 ± 5.0	15.4 ± 1.4
SNCVd (m/s)	3.7 ± 0.5	7.3 ± 0.5	4.2 ± 0.8	7.4 ± 0.5

Taula 3: Resultats dels tests d'electrofisiologia realitzats a les potes lesionades (*crush*) dels ratolins diabètics, control i tractats, injectats amb els vectors virals AAV1GFP i AAV1IGF-I respectivament, 24 i 31 dies després de la lesió. $p < 0.05$ versus ^a AAV1-GFP, al mateix temps de seguiment. Anàlisi estadística realitzada mitjançant ANOVA amb tests posthoc Bonferroni. Resultats expressats com a mitjana ± SEM. CMAP: Potencial d'acció compost a múscul; CNAP: Potencial d'acció compost a nervi; MNCV: velocitat de conducció nerviosa motora; SNCV: velocitat de conducció nerviosa sensorial; -p: segment proximal del nervi; -d: segment distal del nervi. Totes les amplituds CMAP i CNAP s'obtenen a partir de l'estimulació de l'escotadura ciàtica.

1.3.3.3. Anàlisi morfològica de nervis tibials intactes

Les característiques morfològiques generals observades en talls semifins de nervis tibials intactes (Figura 37) eren semblants en ratolins control i ratolins tractats. No s'observaren diferències entre els valors de les mitjanes del nombre de fibres mielinitzades (MF), entre els valors del diàmetres axonal i el diàmetre de la fibra, ni en la ratio g (ratio entre el perímetre de la fibra i el perímetre de l'axó) dels dos grups. Les dades obtingudes es mostren a la taula 4.

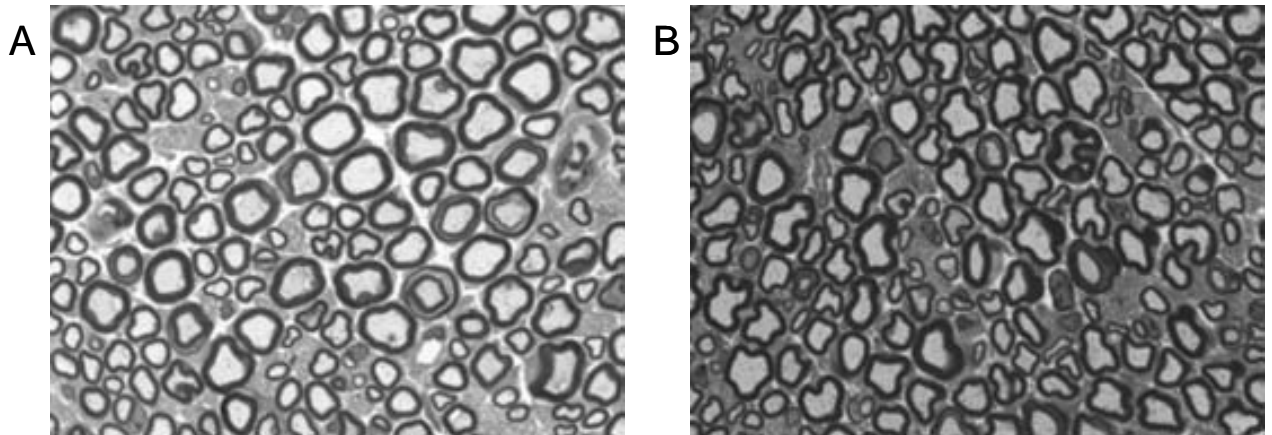


Figura 37: Talls semifins de nervis tibials intactes d'animals control (A) i animals tractats (B), captats per microscòpia de camp clar a l'objectiu 100x a l'oli.

	AAV1-GFP (n=6)	AAV1-IGF-I (n=6)
Nombre de FM	1149 ± 115	1160 ± 70
Diàmetre FM (µm)	5.44 ± 0.12	5.80 ± 0.20
Diàmetre axonal (µm)	3.14 ± 0.10	3.16 ± 0.20
g ratio	0.622 ± 0.017	0.601 ± 0.049
Gruix de la mielina (µm)	1.15 ± 0.10	1.34 ± 0.07

Taula 4: Resultats de l'avaluació morfomètrica de fibres mielinitzades (MF) en nervis tibials intactes de ratolins diabètics, controls i tractats, injectats amb els vectors virals AAV1GFP i AAV1IGF-I, respectivament, tres i quatre setmanes després de la injecció.

No es van realitzar anàlisis morfomètriques de les potes lesionades perquè no es van trobar canvis significatius a nivell electrofisiològic.

2.Teràpia gènica per neuropatia diabètica mitjançant AAVrh10IGF-I

Els resultats obtinguts per AAV1IGF-I són prometedors pel tractament de ND encara que no veiem resultats significatius. Tanmateix, vista l'eficiència del serotip AAVrh10 i degut que l'afectació dels nervis somàtics en ND és tant a nivell motor com sensorial, vam analitzar la capacitat d'aquest vector viral codificant pel factor neurotròfic IGF-I com a tractament per la ND.

2.1. Construcció de genomes virals amb el factor de creixement IGF-I

En estudis comparatius entre els vectors ssAAVCAGGFPWPRE i scAAVCMVGFP, es va observar un augment dels nivells d'expressió dels sc respecte els ss almenys a setmana 1. A partir d'aquí vam decidir utilitzar un vector sc pels assajos de teràpia gènica amb AAVrh10 en el model de ND. IGF-I és un factor de creixement codificat per un cDNA de 700pb, per tant en aquest cas no hi ha restriccions de mida.

IGF-I es va clonar per *XhoI/NotI* en el lloc de la GFP dins del plàsmid pAAV-CMV-GFP segons es detalla a materials i mètodes (Figura 38). A partir d'aquest punt es van generar vectors recombinants scAAV2/rh10CMV IGF-I.

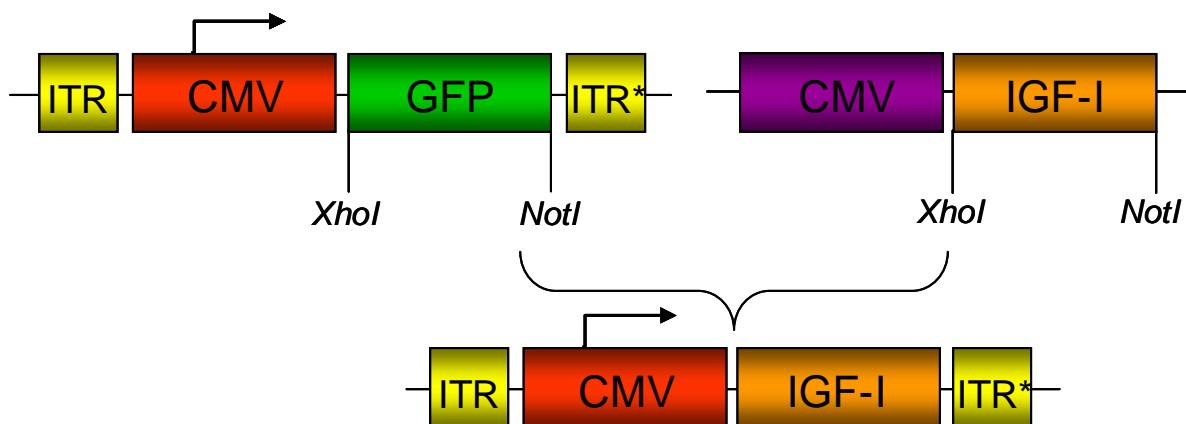


Figura 38: Construcció del plàsmid *pAAVCMVIGF-Isc*. CMV: promotor de citomegalovirus; ITR* *Inverted Terminal Repeat* mutada.

2.2. Disseny experimental

Quant al disseny experimental d'aquest estudi, es va seguir el mateix disseny descrit per l'estudi de teràpia gènica amb el vector AAV1, a l'apartat 1. de la part II de resultats.

S'induïa diabetis experimental a ratolins ICR de 8 setmanes d'edat, mitjançant cinc injeccions consecutives de STZ a 45 mg/kg. Els animals diabètics es distribuïen en dos grups, ratolins ICR diabètics control i ICR diabètics tractats, en funció del virus administrat. No es van observar diferències entre els pesos i les glucèmies dels animals control i animals tractats al llarg de l'estudi (Figura 39).

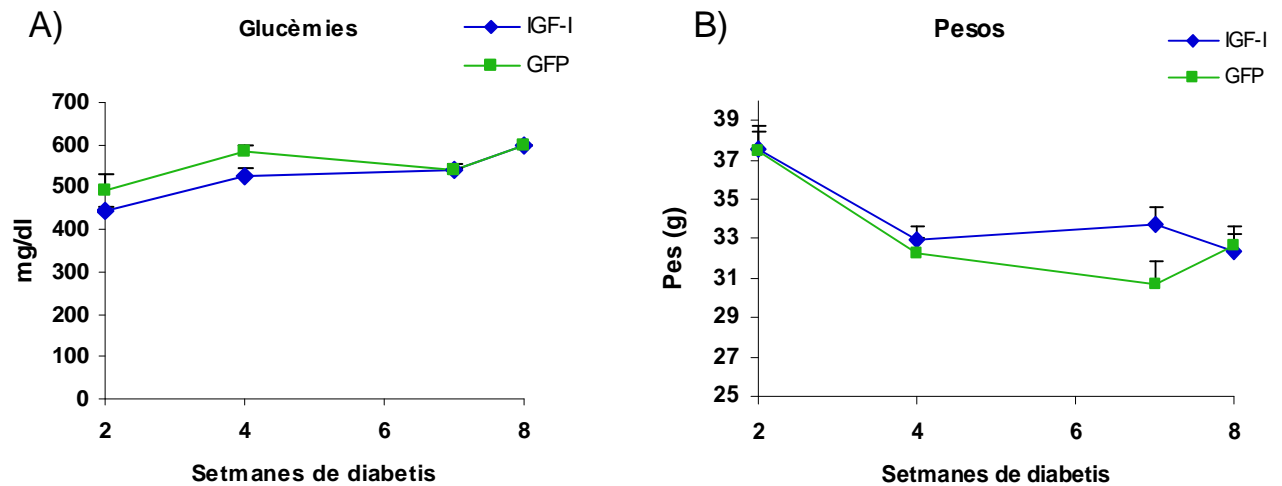


Figura 39: **A)** Representació de la concentració de glucosa en sang (mg/dl) 2, 4, 7 i 8 setmanes després de la inducció de la diabetis amb STZ, en controls (GFP) i tractats (IGF-I). **B)** Pesos obtinguts (g) dels animals controls i tractats al llarg de l'estudi.

Un mes després de la inducció de la diabetis es van injectar $6 \cdot 10^{10}$ vg als animals via intratecal. El grup ratolins control van ser injectats amb de AAVrh10-CMV-GFP i els tractats amb AAVrh10-CMV-IGF-I. Al mateix dia de l'administració del virus, els animals se sotmetien a la lesió quirúrgica *crush*, a una de les potes (Figura 40).

Vint-i-quatre i trenta un dies després de la lesió i de l'administració del virus, es realitzaven tests electrofisiològics per avaluar la velocitat de conducció nerviosa i la capacitat de regeneració, dels ratolins control i tractats. A dia 31, finalitzades les proves electrofisiològiques es van sacrificar els animals i es van obtenir mostres de DRG i ME de la regió lumbar, nervi ciàtic i nervi tibial, per realitzar els estudis pertinents.

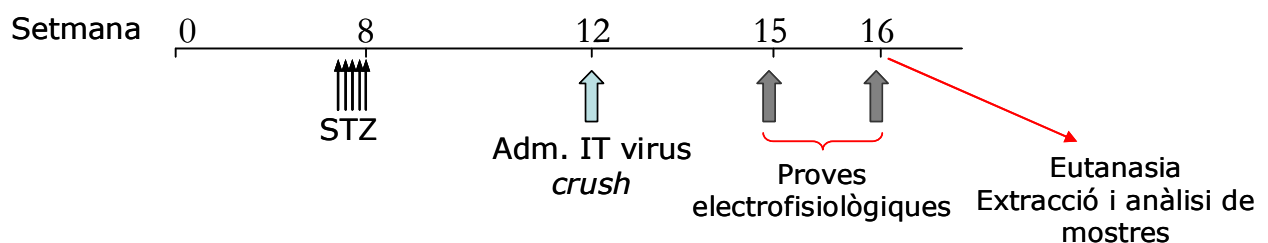


Figura 40: Esquema del disseny experimental seguit en l'estudi de teràpia gènica per neuropatia diabètica mitjançant AAVrh10.

2.3. Estudi de l'eficiència de transducció d'AAVrh10IGF-Isc a sistema nerviós perifèric en un model murí per neuropatia diabètica

2.3.1. Quantificació de l'expressió d'IGF-I en animals transduïts

Es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica contra IGF-I en els DRG del grup d'animals controls i tractats (Figura 41). A les imatges captades per microscòpia confocal de cada gangli, als mateixos ajustaments, es va observar que els ganglis transduïts amb AAVrh10IGF-I tenien una senyal molt més elevada per IGF-I (Figura 41C) que el gangli control (Figura 40A). Si comparàvem els nivells d'IGF-I en ganglis tractats per AAV1IGF-I (Figura 41B) amb els nivells d'IGF-I a ganglis tractats amb AAVrh10IGF-I, observàvem una senyal molt més intensa en els ganglis transduïts amb AAVrh10IGF-I. Com s'havia observat en estudis de tropisme, AAVrh10 manté uns nivells d'infectivitat més elevats que el vector AAV1. Com per AAV1, les imatges es van captar per microscòpia confocal de forma seqüencial, fixant els ajustaments per el làser 568 (color vermell).

Quan es van mesurar per ELISA, els nivells del transgen presents a líquid cefaloraquidi dels animals injectats amb AAVrh10 IGF-I presentaven un augment d'IGF-I a LCR unes vint vegades respecte els nivells obtinguts en animals control i, si ho comparàvem amb els nivells d'IGF-I obtinguts en animals tractats amb AAV1IGF-I, es va observar un increment d'unes cinc vegades amb AAVrh10IGF-I (* $p < 0,05$) (Figura 41D).

Per quantificar els nivells de mRNA d'IGF-I a DRG, vam partir d'extractes de RNA de DRG i es van quantificar per qPCR (Figura 41E). Es va observar un increment de més de 75 vegades els nivells de RNA d'IGF-I en DRG en la pota intacte del grup tractat respecte als del grup control (** $p < 0,001$). Els valors obtinguts es representen en nivells d'expressió relatius de RNA d'IGF-I, normalitzats amb el mRNA del gen 36B4 i es realitzà una anàlisi estadística mitjançant el test t Student.

Per tal de veure si l'augment dels nivells d'expressió d'IGF-I eren suficients per activar la seva via de senyalització a través de PI3K/Akt, vam analitzar per western-blot l'expressió de la proteïna Akt-fosforilada (Akt-P) (activada) a DRG en la pota intacte d'animals controls i tractats (Figura 42A). Es van quantificar per densitometria els nivells relatius de Akt-P respecte Akt total i les diferències obtingudes entre animals control i tractats van ser prop de 2,5 vegades superiors (* $p < 0,05$) (Figura 42B). IGF-I, a més d'activar diferents vies de senyalització i promoure la supervivència cel·lular, també intervé en la regulació dels nivells d'expressió de diversos factors tròfics entre ells VEGF. Es van analitzar els nivells del factor VEGF per western-blot a DRG de

la pota intacte (Figura 41C). Els nivells d'expressió de VEGF als animals tractats eren 1,6 vegades més alts que en els animals control (* $p < 0,05$) (Figura 42D).

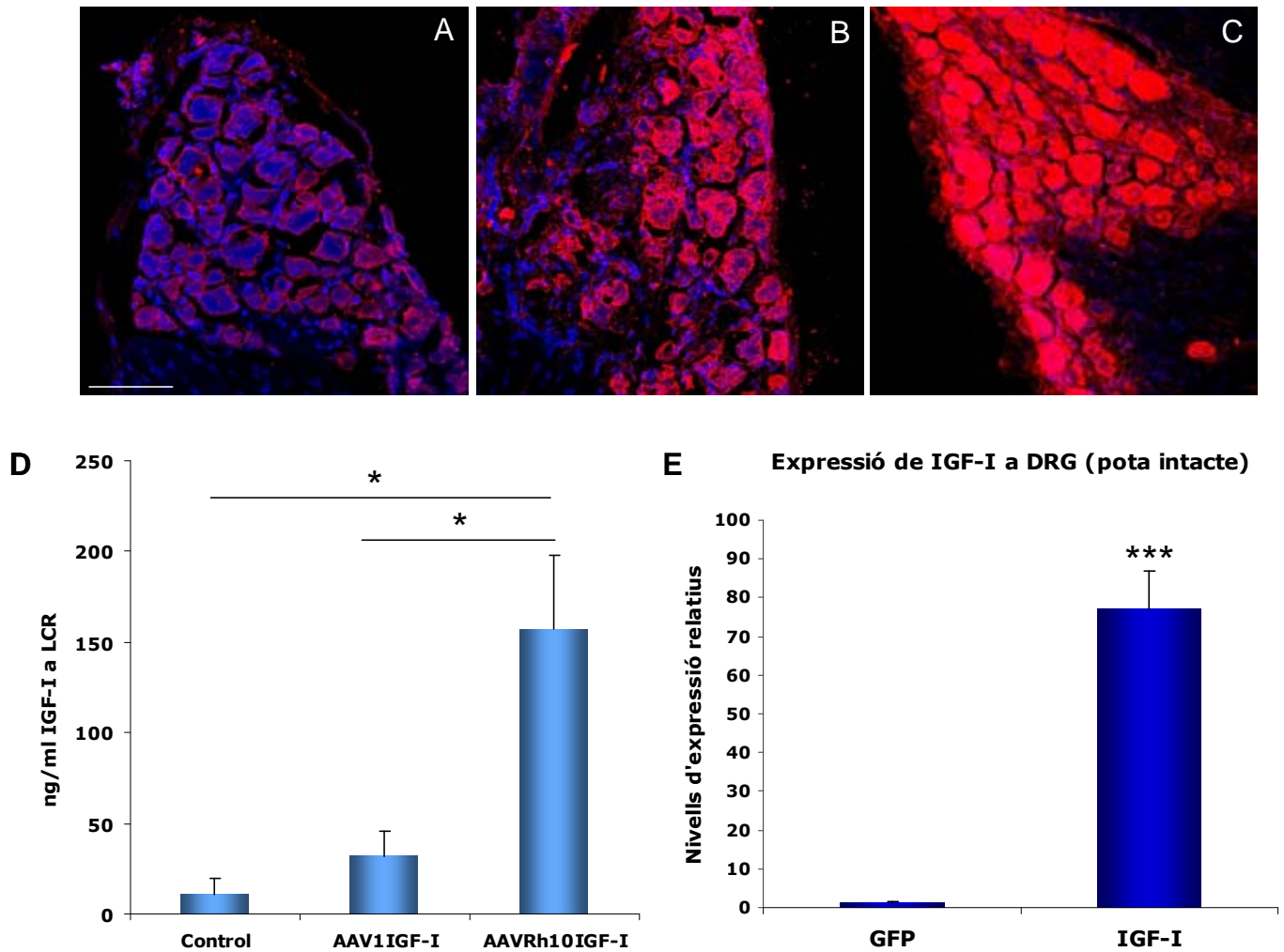


Figura 41: Estudi dels nivells d'expressió d'IGF-I un mes després de la injecció intratecal dels vectors virals AAVrh10GFP i AAVrh10IGF-I. A): Anàlisi immunohistològica del factor neurotròfic IGF-I. Talls histològics de DRG controls (A) i tractats (B) AAV1IGF-I i (C) AAVrh10IGF-I, van ser incubats amb l'anticòs contra IGF-I (vermell) i amb el marcador de nuclis hoechst (blau) (----160micres). **B)** Quantificació dels nivells d'IGF-I a líquid cefaloraquidi de ratolins control (n=2) i tractats (n=3) (ng/ml). **C)** Representació dels nivells d'expressió relatius de mRNA d'IGF-I a DRG mitjançant qPCR a la pota intacte (n=5 pels controls i n=4 pels tractats). Els resultats es representen com la mitja±SEM (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

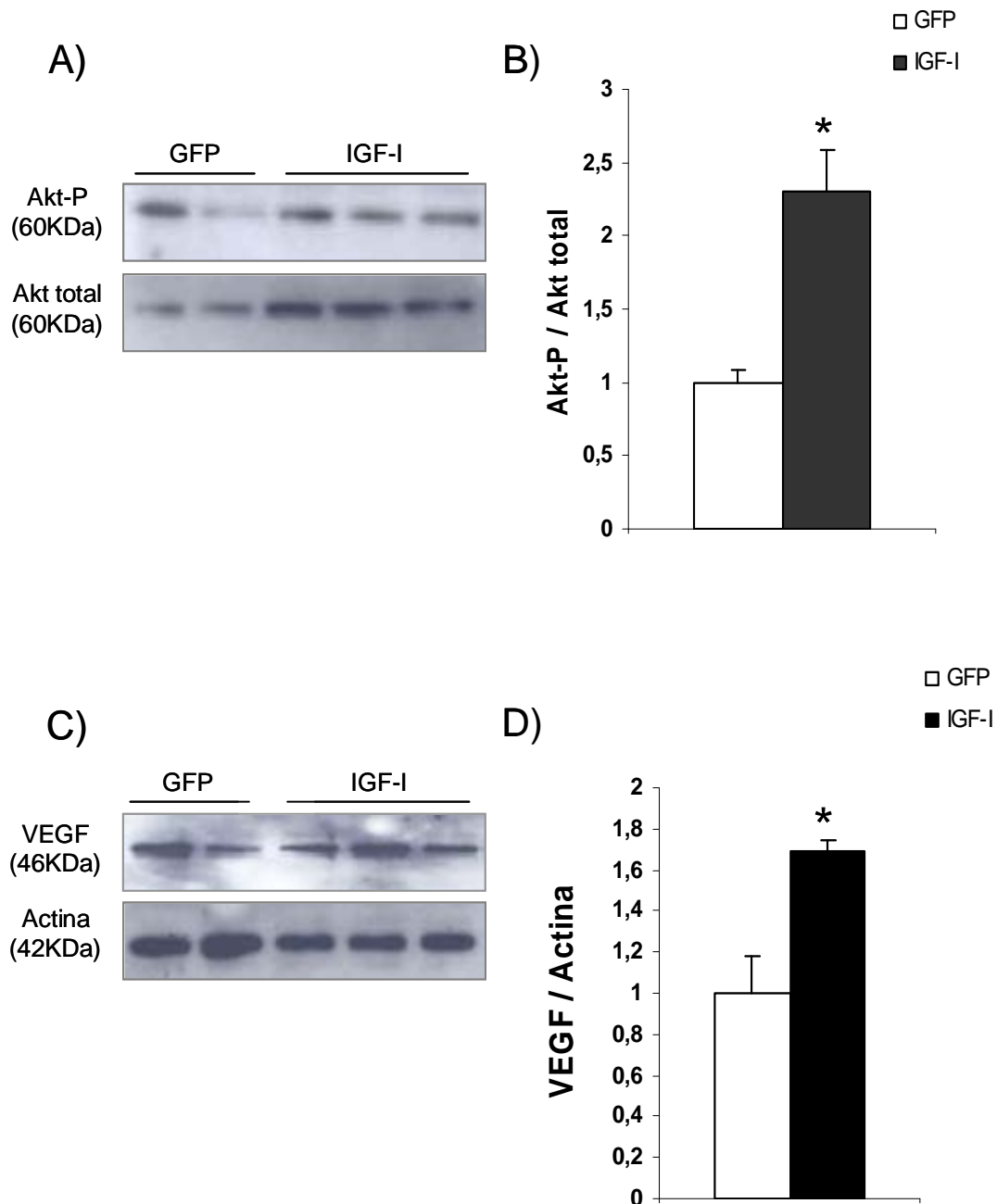


Figura 42: Anàlisi de l'activació de la via de senyalització d'IGF-I a DRG un mes després de la administració intratecal dels vectors virals AAVrh10GFP i AAVrh10IGF-I. **A)** Immunodetecció per WB d'Akt-P a partir d'extractes proteics de DRG d'animals control i tractats. **B)** Densitometria de les bandes dels resultats obtinguts per WB. Els resultats es representen com la mitja±SEM, n=2 per controls i n=3 pels tractats, s'expressen com a nivells relatius de proteïna de Akt-P/Akt total. **C)** Immunodetecció per WB de VEGF a partir d'extractes proteics de DRG d'animals control i tractats. **D)** Densitometria de les bandes dels resultats obtinguts per WB. Els resultats es representen com la mitja±SEM, n=2 per controls i n=5 pels tractats, i s'expressen com a nivells relatius de proteïna de VEGF/Actina (*p<0,05).

2.3.2. Determinació molecular de la capacitat regenerativa d'IGF-I en neuropatia diabètica

Es van quantificar els nivells d'expressió del mRNA d'IGF-I a ganglis de la regió lesionada, a partir d'extractes de RNA de DRG. Es va observar un augment d'unes 15 vegades els nivells d'IGF-I en DRG dels animals del grup tractat respecte els del grup control (** $p < 0,001$) (Figura 43).

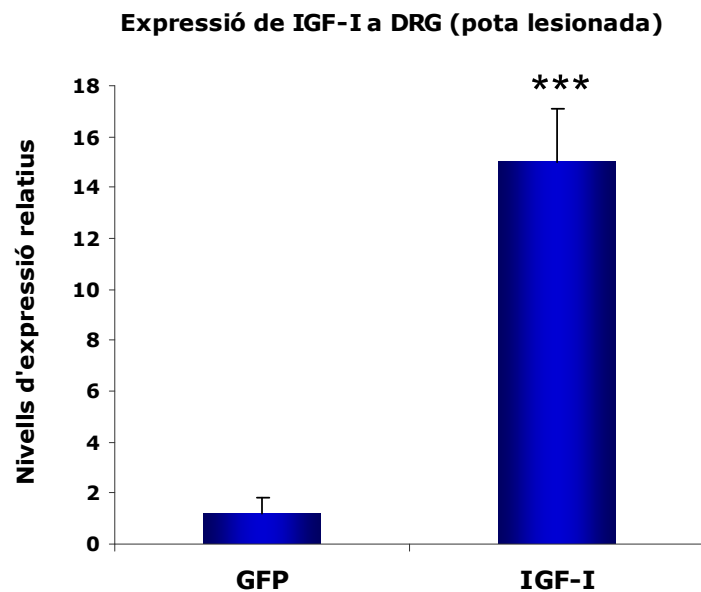


Figura 43: Estudi dels nivells d'expressió d'IGF-I un mes després de la injecció intratecal dels vectors virals AAVrh10GFP i AAVrh10IGF-I, a la pota lesionada. Nivells d'IGF-I a DRG (n=6 pels controls i n=5 pels tractats). Els resultats es representen com la mitja \pm SEM (** $p < 0,001$).

Així els animals injectats amb el vector AAVrh10IGF-I a DRG, produïen nivells de mRNA de GAP43 d'unes quatre vegades superior respecte els animals control (** $p < 0,01$) (Figura 44A).

Mitjançant western-blot es van mesurar els nivells de proteïna GAP43 a DRG, de la pota lesionada, en els dos grups d'animals, controls i tractats (Figura 44B). Tot i que els nivells d'expressió de GAP43 ja es veuen augmentats quan es produeix lesió, vam observar un increment significatiu de 2,5 vegades en els animals tractats, per sobre dels nivells obtinguts pel grup control (* $p < 0,01$) (Figura 44C). L'augment dels nivells de la proteïna GAP43 suggereixen un efecte positiu d'IGF-I en la capacitat de regeneració en condicions de diabetis, quan hi ha lesió.

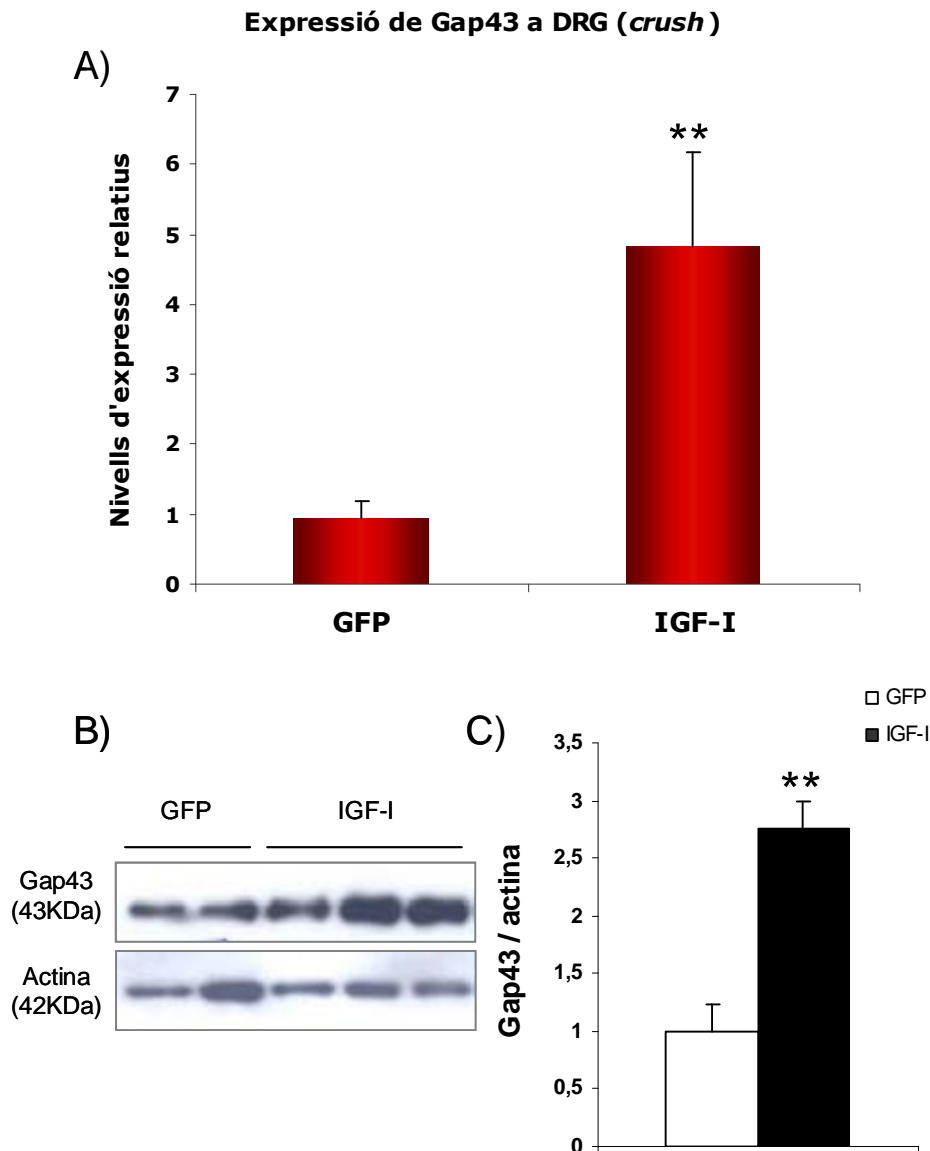


Figura 44: Estudis dels nivells d'expressió de la proteïna GAP43 a DRG de la pota lesionada, un mes després de la lesió a nervi ciàtic i de la injecció intratecal dels vectors virals AAVrh10GFP i AAVrh10IGF-I. A) Quantificació dels nivells d'expressió de mRNA de GAP43 mitjançant qPCR (n=4 pels control i n=3 pels tractats). **B)** Immunodetecció de la proteïna GAP43 a partir d'extractes proteïcs de DRG d'animals control i tractats. **C)** Quantificació mitjançant densitometria de les bandes dels resultats obtinguts per WB (**p<0,01) (n=2 pels controls i n=3 pels tractats), s'expressen com a nivells relatius de proteïna de GAP43/Actina. Els resultats es representen com a mitja±SEM

Tal i com s'havia fet per AAV1, es van mesurar els nivells d'expressió de gens mielinitzants P0, PMP22, MAG i MBP a nervi ciàtic lesionat per qPCR (Figura 45A).

En els animals tractats amb AAVrh10 IGF-I, P0 presentava un augment entre 20 i 25 vegades respecte als animals tractats amb AAVrh10 GFP (**p<0,001), PMP22 i MAG estaven augmentats entre 10 i 15 vegades respecte els controls (**p<0,01) i MBP només 3 vegades (*p<0,05).

Per western-blot es van analitzar els nivells d'expressió de la proteïna P0 (Figura 45B). Es va observar un increment de P0 a nervi ciàtic lesionat de ratolins tractats amb IGF-I respecte els control (Figura 45C), però no es van poder observar diferències significatives degut a la variabilitat en els nivell d'expressió dins del grup de ratolins tractats.

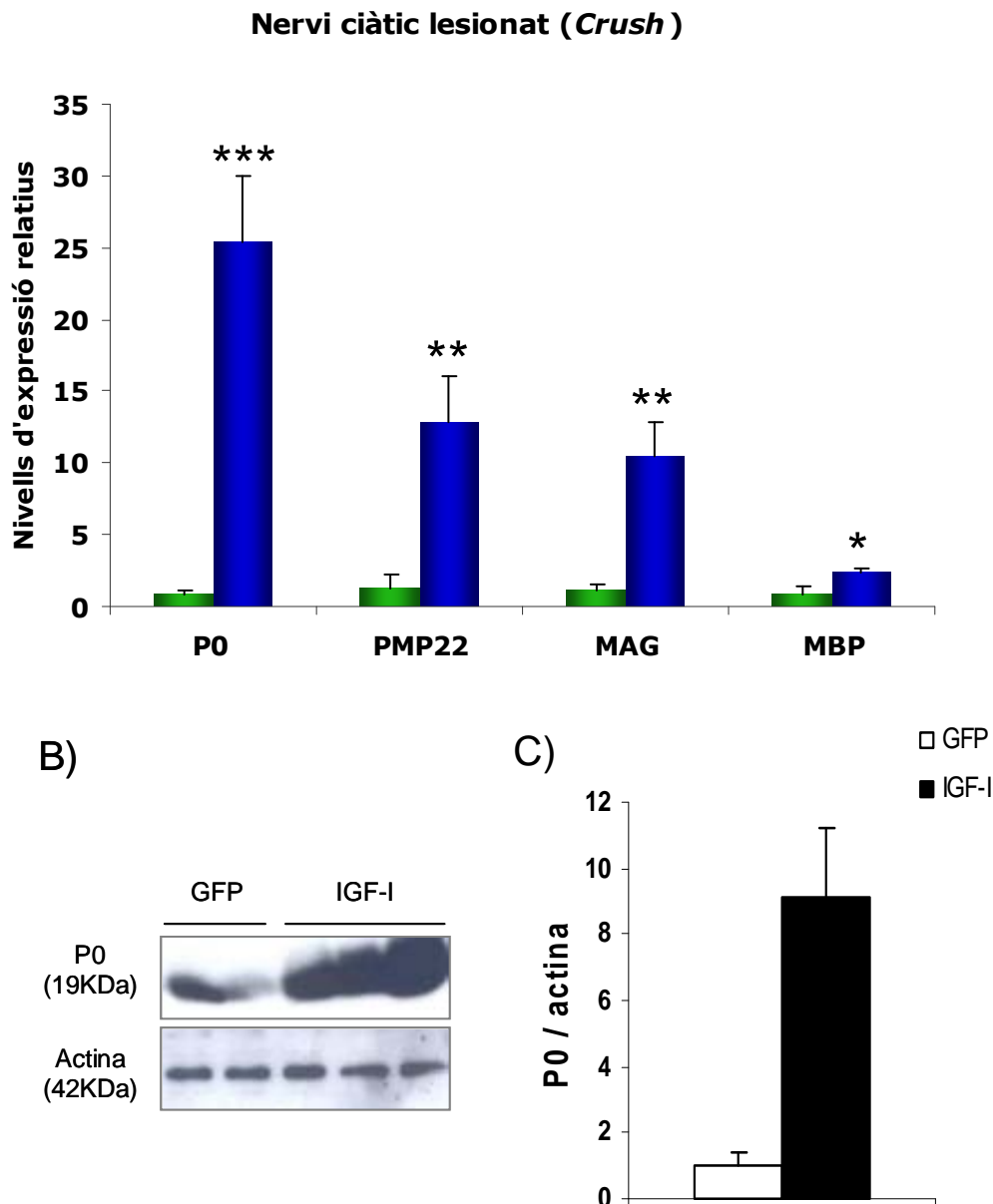


Figura 45: Estudis dels nivells d'expressió de les proteïnes de la mielina P0, PMP22, MAG i MBP a nervi ciàtic lesionat, un mes després de la injecció intratecal dels vectors virals AAVrh10GFP i AAVrh10IGF-I. **A)** Quantificació dels nivells d'expressió de mRNA de P0, PMP22, MAG i MBP mitjançant qPCR. (P0: n=4 tractats; PMP22: n=4 tractats; MAG: n=5 tractats; MBP: n=5 tractats; n=3 controls). Nivells d'expressió relatius representats com a valors de la mitja±SEM (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). **B)** Immunodetecció de la proteïna P0 a partir d'extractes proteics de nervi ciàtic lesionat d'animals control i tractats. **C)** Quantificació mitjançant densitometria de les bandes dels resultats obtinguts per WB (n=2 pels controls i n=3 pels tractats). Els resultats es representen com la mitja±SEM i s'expressen com a nivells relatius de proteïna de P0/Actina.

2.3.3. Determinació de l'efecte de AAVrh10IGF-I a neurones motores

Es van analitzar els nivells d'expressió d'IGF-I a medul·la espinal per anàlisi immunohistoquímica de talls transversals. Per microscòpia confocal, als talls de ME control i tractats, als mateixos ajustaments pel làser 568 (color vermell), es va observar un augment dels nivells d'expressió d'IGF-I a ME del grup de ratolins tractats respecte els control (Figura 46).

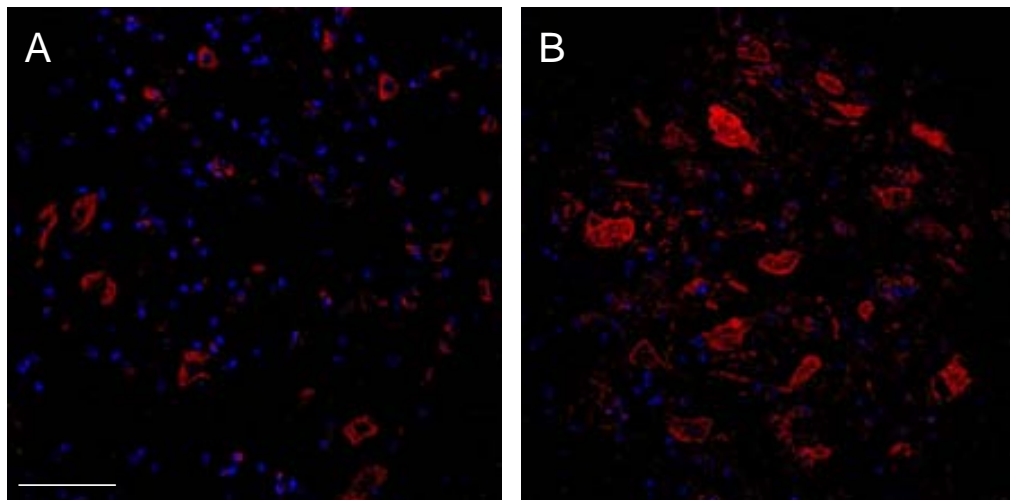


Figura 46: Anàlisi immunohistològica del factor neurotròfic IGF-I a ME d'animals transduïts amb AAVrh10IGF-I. Talls histològics de ME controls (A) i tractats (B) AAVrh10IGF-I, van ser incubats amb l'anticòs contra IGF-I (vermell) i amb el marcador de nuclis hoechst (blau) (---73µm).

Per tal d'analitzar els nivell d'expressió d'IGF-I a medul·la mitjançant qPCR, es van realitzar extractes de RNA de la regió lumbar de ME de ratolins control i tractats. Es van obtenir nivells d'IGF-I significativament més alts respecte a les ME control (**p<0,01), uns nivells d'expressió unes 10 vegades superior pels animals tractats, tant a la pota intacte com en la lesionada (Figura 47A i B).

La proteïna GAP43 en condicions normals s'expressa principalment en neurones sensorials petites, però quan es produeix lesió és expressada per totes les neurones sensorials i motores. Per poder observar un efecte positiu d'IGF-I en la regeneració de neurones motores, es va quantificar per qPCR els nivells d'expressió relatius de GAP43, en la regió de la medul·la espinal de la pota lesionada. Els nivells de mRNA per GAP43 a ME dels nervis lesionats tractats eren el doble que en els controls (**p<0,01) (Figura 47C).

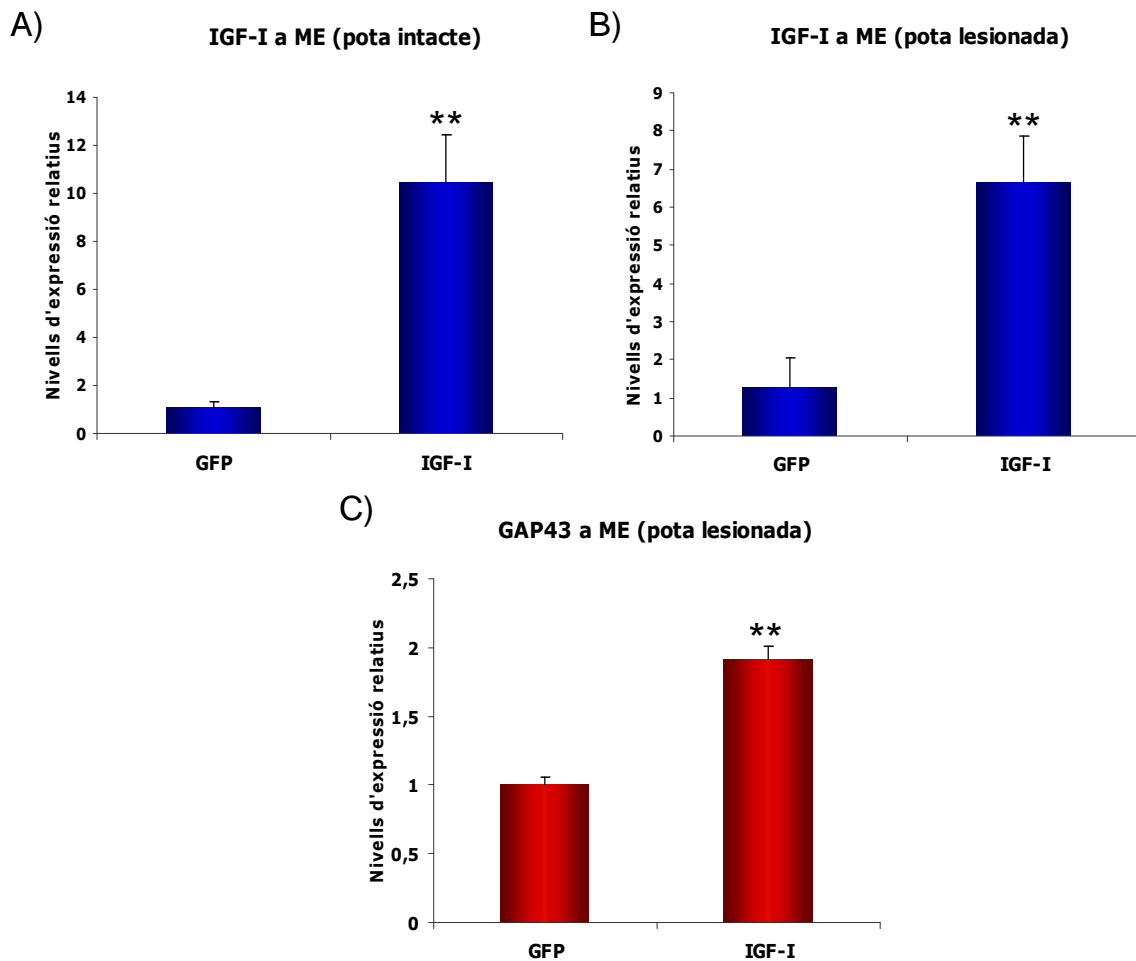


Figura 47: Estudi dels nivells d'expressió d'IGF-I i GAP43 un mes després de la injecció intratecal dels vectors virals AAVrh10GFP i AAVrh10IGF. Representació dels nivells d'expressió relatiu de mRNA a ME mitjançant qPCR. **A)** Nivells d'IGF-I a ME de la regió intacte, (n=4 pels control i n=6 pels tractats). **B)** Nivells d'IGF-I a ME de la regió lesionada, (n=4 pels controls i n=6 pels tractats). **C)** Quantificació del mRNA de GAP43 a la regió lesionada de ME, (n=2 pels controls i n=5 pels tractats). Els resultats es representen com la mitja±SEM (**p<0,01).

2.3.4. Estudis neurofisiològics dels animals injectats amb el vector AAVrh10IGF-I

2.3.4.1. Avaluació de la velocitat de conducció nerviosa a nervi intacte

Es van realitzar proves electrofisiològiques a setmana 7 i 8 després de la inducció de la diabetis. Els resultats de les proves electrofisiològiques dels nervis ciàtics intactes es mostren a la taula 5. En aquesta taula es representen els valors a 3 i 4 setmanes després de l'administració del vector viral. En el grup de ratolins tractats es va observar, tant a 3 com a 4 setmanes després de l'administració del vector, un augment de les velocitats de conducció nerviosa motora i sensorial, respecte els ratolins control, no obstant els valors no eren significativament diferents. En els ratolins tractats, es va observar que els valors de l'amplitud del potencial d'acció compost evocat

plantar, CNAP, presentava canvis significatius respecte els controls, a setmana 4 després de l'administració del virus (Taula 5).

<i>Paràmetre</i>	<i>Tractament</i>			
	AAVrh10-GFP (n=7)		AAVrh10-IGF-I (n=15)	
Setmana p.i	3	4	3	4
<i>Múscul plantar</i>				
CMAP (mV)	6.6 ± 0.9	6.3 ± 0.6	6.3 ± 0.3	5.5 ± 0.3
MNCV (m/s)	34.7 ± 2.1	36.7 ± 3.2	41.3 ± 2.2	42.3 ± 2.6
<i>Nervi digital</i>				
CNAP (µV)	29.2 ± 3.0	19.0 ± 3.1	36.3 ± 3.0	31.2 ± 2.6 ^a
SNCVp (m/s)	40.2 ± 1.7	44.6 ± 2.8	44.1 ± 2.8	46.7 ± 2.4
SNCVd (m/s)	28.1 ± 1.4	24.8 ± 0.9	28.6 ± 0.9	25.6 ± 0.6

Taula 5: Resultats dels tests d'electrofisiologia realitzats a les potes intactes dels ratolins diabètics, controls i tractats, injectats amb els vectors virals scAAVrh10GFP i scAAVrh10 IGF-I, respectivament. Els tests es realitzen a tres i quatre setmanes després de l'administració intratecal del vector. $p < 0.05$ versus ^a AAVrh10-GFP, al mateix temps de seguiment. Anàlisi estadística realitzada mitjançant ANOVA amb tests posthoc Bonferroni. Resultats expressats com a mitjana mean ± SEM. CMAP: Potencial d'acció compost a múscul; CNAP: Potencial d'acció compost a nervi; MNCV: velocitat de conducció nerviosa motora; SNCV: velocitat de conducció nerviosa sensorial; -p: segment proximal del nervi; -d: segment distal del nervi. Totes les amplituds CMAP i CNAP s'obtenen a partir de l'estimulació de l'escotadura ciàtica.

2.3.4.2. Avaluació de la capacitat de regeneració nerviosa a nervi lesionat

Es van realitzar tests d'electrofisiologia per poder avaluar la capacitat de regeneració dels nervis perifèrics en la pota lesionada, els resultats obtinguts es mostren a la Taula 6. La reinnervació distal dels músculs i dels nervis es va avaluar mitjançant proves de conducció nerviosa a 24 i 31 dies després de la lesió. A dia 24 post-lesió i administració del vector viral (set setmanes de diabetis), vam observar que els ratolins tractats presentaven un augment de la velocitat de conducció nerviosa motora, MNCV, respecte els controls. Tot i així, en ambdós grups no es van poder detectar velocitats de conducció nerviosa sensorial, degut al retard de la regeneració en diabetis. Després de 8 setmanes de diabetis, i 31 dies post lesió i administració del vector viral, es van observar valors significatius en les velocitats de conducció nerviosa tant sensorial (SNCVd) com motora (MNCV), en animals tractats respecte els control. Les dades

obtingudes pel grup d'animals tractat, dels diferents paràmetres analitzats, són valors pròxims als resultats obtinguts en estudis preliminars realitzats en ratolins ICR no diabètics amb lesió (Annex II).

<i>Tractament</i>	AAVrh10-GFP (n=7)		AAVrh10-IGF-I (n=15)	
<i>Paràmetre</i>				
Dies post-lesió	24	31	24	31
<i>M tibialis ant.</i>				
CMAP (mV)	14.0 ± 1.0	23.1 ± 1.6	14.7 ± 1.6	23.6 ± 2.5
<i>Múscul plantar</i>				
CMAP (mV)	0.63 ± 0.12	1.11 ± 0.32	0.64 ± 0.12	1.18 ± 0.18
MNCV (m/s)	10.4 ± 2.1	13.7 ± 0.7	16.1 ± 1.3 ^a	18.8 ± 1.2 ^a
<i>Nervi digital</i>				
CNAP (µV)	0 ± 0	2.60 ± 1.08	0.92 ± 0.64	3.67 ± 0.78
SNCVp (m/s)		21.2 ± 6.1		23.8 ± 1.3
SNCVd (m/s)		6.0 ± 0.7		10.0 ± 1.9 ^a

Taula 6: Resultats dels tests d'electrofisiologia realitzats a les potes lesionades (*crush*) dels ratolins diabètics, control i tractats, injectats amb els vectors virals scAAVrh10GFP i scAAVrh10IGF-I respectivament, 24 i 31 dies després de la lesió. $p < 0.05$ versus ^a AAVrh10-GFP, al mateix temps de seguiment. Anàlisi estadística realitzada mitjançant ANOVA amb tests posthoc Bonferroni. Resultats expressats com a mitjana ± SEM. CMAP: Potencial d'acció compost a múscul; CNAP: Potencial d'acció compost a nervi; MNCV: velocitat de conducció nerviosa motora; SNCV: velocitat de conducció nerviosa sensorial; -p: segment proximal del nervi; -d: segment distal del nervi. Totes les amplituds CMAP i CNAP s'obtenen a partir de l'estimulació de l'escotadura ciàtica.

2.3.4.3. Anàlisi morfològica de nervis tibials intactes

La mitjana dels valors d'anàlisi morfològica de nervis tibials dels dos grups controls i tractats es mostren a la taula 6. La microestructura general de les seccions en quant a l'àrea del nervi i densitat de fibres mielinitzades és semblant entre els dos grups (Figura 48). Tal i com havíem vist per AAV1 no s'observen canvis significatius quant a mida de les fibres axonals mielinitzades, ni en el gruix de la mielina ni tampoc en la ratio (g) (ratio entre el perímetre de la fibra i el perímetre de l'axó), entre els nervis tibials intactes dels diferents grups.

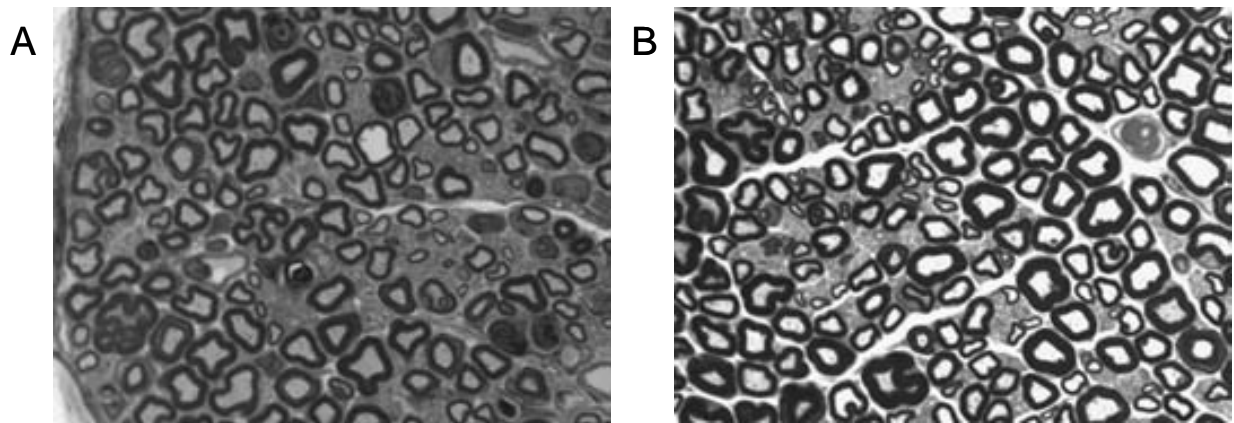


Figura 48: Talls semifins de nervis tibials intactes d'animals control (A) i animals tractats (B), captats per microscòpia de camp clar a l'objectiu 100x a l'oli.

	AAVrh10-GFP (n=4)	AAVrh10-IGF-I (n=6)
Nombre de FM	1081 ± 91	1082 ± 50
Diàmetre FM (µm)	5.58 ± 0.11	5.82 ± 0.13
Diàmetre axonal (µm)	3.13 ± 0.08	3.35 ± 0.08
g ratio	0.615 ± 0.004	0.628 ± 0.007
Gruix de la mielina (µm)	1.22 ± 0.03	1.23 ± 0.03

Taula 7: Resultats de l'avaluació morfomètrica de fibres mielinitzades (MF) en nervis tibials intactes de ratolins diabètics, controls i tractats (injectats amb els vectors virals scAAVrh10GFP i scAAVrh10IGF-I, respectivament), tres i quatre setmanes després de la injecció.

V. DISCUSSION

PART I: CARACTERITZACIÓ DEL TROPIMSE DELS VECTORS ADENO-ASSOCIATS A SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC

El sistema nerviós perifèric, incloent nervis perifèrics i ganglis de l'arrel dorsal (DRG), estan involucrats en nombrosos desordres neurològics, com neuropaties perifèriques adquirides (neuropatia diabètica), i malalties genètiques desmielinitzants (esclerosi múltiple, distròfia muscular congènita, Charcot-Marie-Tooth) i també dolor crònic, entre d'altres. La modificació genètica dels diferents components del sistema nerviós perifèric, com les neurones sensorials i les neurones motores, suposen un tractament alternatiu per actuar davant de malalties dels nervis perifèrics.

Els vectors virals són una bona eina per la teràpia gènica pel tractament de malalties, ja siguin hereditàries o adquirides. La utilització d'aquests vectors ens permet transduir específicament els teixits o òrgans que estan afectats i poder expressar el gen o gens necessaris pel correcte funcionament del teixit danyat. Amb tècniques d'enginyeria genètica s'han pogut modificar els diferents vectors virals per eliminar la seva capacitat replicativa, i mantenir la capacitat infectiva necessària per sobreexpressar el gen d'interès i no alterar la fisiologia de la cèl·lula transduïda.

La transferència gènica a sistema nerviós perifèric presenta un interès especial perquè conté diversos tipus cel·lulars, molts dels quals són post-mitòtics. L'administració de gens de manera selectiva al SNP pot conduir a diverses aplicacions importants en el camp de la teràpia gènica per malalties neurològiques i tractament del dolor. A més a més dels estudis anatòmics, la transferència gènica mediada per un vector viral permet realitzar estudis de processos fisiològics com el transport retrògrad i anterògrad de virus i de proteïnes al llarg dels axons i les dendrites. L'administració de gens codificant per proteïnes com factors neurotròfics, selectivament en el SNP, són noves estratègies terapèutiques que s'estan duent a terme pel tractament de l'atrofia muscular espinal, l'esclerosi lateral amiotròfica o diverses neuropaties hereditàries o adquirides (Wang *et al.*, 2002; Kaspar *et al.*, 2003; Dodge *et al.*, 2008; Mastroeni *et al.*, 2009).

Cal, però, un estudi exhaustiu del tropisme viral i de l'estabilitat del vector *in vivo* per poder entendre millor la capacitat terapèutica de cada vector. No obstant, el desconeixement de les vies que utilitza cada vector per infectar les cèl·lules, és a dir, els mecanismes d'entrada a la

cèl·lula mitjançant receptors específics o altres vies de transport cel·lular a través de porus de membrana, etc., dificulten aquesta caracterització.

Tot i la diversitat de virus coneguts fins aleshores, a l'inici d'aquest treball ens vam centrar en caracteritzar el tropisme dels virus Adeno-associats. Aquests virus tenen només 20 nm de diàmetre, pel que el seu genoma té poc espai per contenir gens terapèutics, però, per altra banda, tenen la capacitat de difondre més en els teixits. A més a més, són menys immunogènics que els Ad, i els virus recombinants no s'integren en el genoma de la cèl·lula diana, evitant riscos de mutagènesi insercional. Tots aquests són punts a tenir en compte quant a la tria d'un vector viral de teràpia gènica pel tractament de malalties cròniques en humans.

Els vectors AAV s'han utilitzat de manera eficient per transferir gens a gran varietat de teixits animals. Aquests vectors poden ser injectats en diversos estadis de la vida de l'animal i a diferència de la generació d'animals transgènics, permeten l'estudi de l'efecte de transgens sense tenir en compte les variables que s'hi podrien afegir durant el desenvolupament de l'animal i que poden complicar la interpretació dels resultats. Per tant, aquesta estratègia no només és una alternativa a la generació d'animals transgènics condicionals sinó que també possibilita l'estudi cap a altres espècies de models animals de malaltia diferents del ratolí, a més a més de permetre la introducció de múltiples vectors amb diferents gens al mateix temps. Les possibles aplicacions dels vectors AAV les trobem en la sobreexpressió de gens, la inhibició de l'expressió de proteïnes mitjançant interferència de RNA, o bé l'ús de microRNAs. Així doncs, els AAVs són eines a tenir en compte a l'hora de crear models animals de malaltia (Kirik and Bjorklund, 2003), o bé per aplicacions de teràpia gènica (Xia *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 2005) o fins i tot per estudis de genòmica funcional (Kirik *et al.*, 2002).

Dins del grup de virus Adeno-associats trobem una gran varietat de serotips. L'organització dels diferents serotips d'AAV es realitza en funció de la seva càpside. L'estructura de la càpside és específica de cada serotip. Tot i l'homologia que existeix entre les seqüències del gen Cap, aquestes es diferencien per una petita regió que codifica per VP1, estructura proteica més exterior de la càpside. La VP1 és la seqüència a partir de la qual es classifiquen els AAV en serotips específics. Tanmateix l'estructura de la càpside determina la seva unió amb receptors cel·lulars específics, el que condiciona que molts serotip tinguin un tropisme cel·lular particular (Gao *et al.*, 2004).

Els AAVs són vectors àmpliament utilitzats per transduir diferents teixits com fetge, cor, pulmó, pàncreas, múscul, cèl·lules endotelials i sistema nerviós. En aquest treball hem caracteritzat els tropisme i l'eficiència de transducció a sistema nerviós perifèric de diversos serotips d'AAV i ens hem centrat principalment en els serotips AAV1 i AAVrh10 pel tractament de la neuropatia diabètica.

Les vies d'administració utilitzades habitualment per transduir específicament neurones del SNP són: injecció directe a coixinets, que és on trobem els terminals nerviosos de les fibres sensorials del nervi ciàtic; intramuscular, regions molt innervades tant per neurones motores com sensorials; injecció directe a nervi ciàtic, sistema que permet l'administració del vector directament a les fibres nervioses, ja que el nervi ciàtic és un dels nervis perifèrics més grans i amb més nombre de fibres; injecció directe a gangli; i via intratecal, on la infusió del virus directament a líquid cefaloraquídi permet la difusió d'aquest al llarg de la medul·la espinal, i així arribar a les diferents regions que formen el sistema nerviós perifèric.

Sorprenentment, la capacitat de transducció de diferents serotips d'AAV depèn del sistema d'administració utilitzat. AAV8 presenta tropisme per neurones motores i sensorials quan s'administra via intraperitoneal i via intravenosa, en ratolins nous, tot i que també s'observa transducció en teixits com el sistema nerviós central, cor, pulmó, fetge i múscul esquelètic (Foust *et al.*, 2008). L'eficiència de transducció a SNP i SNC augmenta quan el serotip administrat és AAV9, transduint un 19% de neurones motores, però també s'observa infecció a teixits no nerviosos com fetge, múscul esquelètic i cor (Duque *et al.*, 2009). Quan els AAV són injectats via intratecal, s'observa específicament transducció de sistema nerviós. AAV8 intratecal transdueix neurones sensorials lumbars amb més eficiència que AAV1, observant aproximadament un 75% d'expressió, tanmateix no detecten transducció a motoneurones (Storek *et al.*, 2006; Storek *et al.*, 2008). L'administració directa a gangli aconsegueix infectar un 50% de neurones sensorials amb AAV5, seguit d'AAV6 i AAV1 amb una eficiència de transducció del 37 i 35 % de neurones, respectivament. També observen que AAV6 té la capacitat de transduir cèl·lules satèl·lit. D'entre les neurones sensorials transduïdes aquestes són principalment neurones petites, amb un 35% CGRP+ i un 48% IB4+ (Mason *et al.*, 2010).

En estudis realitzats per Towne *et al.* administren el serotip AAV6 a ratolins, per diferents vies (intracoixinets, intramuscular, intravenós, intraciàtic i intratecal), amb la finalitat de transduir sistema nerviós perifèric. Observen que AAV6 transdueix preferencialment neurones

sensorials petites quan és administrat intracriàtic i intratecal, amb uns percentatges del 28 i el 57% respectivament, l'eficiència de transducció és dosi dependent. També es transdueixen principalment neurones sensorials petites, però amb un patró diferent per les dues vies, per injecció intracriàtic transdueixen majoritàriament neurones CGRP+, en canvi per via intratecal transdueix preferentment IB4+, però la transducció de neurones motores és pràcticament inexistent (Towne *et al.*, 2009).

En canvi, en un model murí per SMA (atrofia muscular espinal), AAV8 injectat intratecalment (regió lumbar i a la regió dels ventricles) a ratolins nounats, observen tropisme per neurones motores al llarg de la medul·la espinal (Passini *et al.*, 2010). L'administració de virus o proteïnes en etapes inicials de la vida dels ratolins permet accedir a teixits com el SNC, ja que a aquesta edat els ratolins no tenen encara la barrera hematoencefàlica ben formada i aquesta és més permeable que no en ratolins adults ni en els humans nounats, on el BH ja està formada des d'abans del naixement. La BH és una estructura que recobreix els sistema nerviós central (cervell i medul·la espinal) i el manté aïllat de la resta del cos, en canvi a sistema nerviós perifèric (DRG i arrels dorsals i ventrals) no presenta una barrera tan definida, si no que està més exposat a la circulació general.

En aquest treball, inicialment es van realitzar estudis *in vitro*, per caracteritzar el tropisme neuronal específic d'AAV1, 2, 8 i rh10 a DRG. Els estudis *in vitro* ens van permetre infectar els DRG de manera eficient amb els vectors AAV1 i AAVrh10, a concentracions baixes dels vectors ($1,5 \cdot 10^8$ vg/gangli). Vam observar que tant AAV1 com AAVrh10 transduïen majoritàriament neurones sensorials petites, fibres C. AAV1 transduïa més eficientment neurones sensorials no peptidèrgiques, positives per IB4, en canvi, AAVrh10 infectava tant neurones peptidèrgiques com no peptidèrgiques, però amb un tropisme preferencial per neurones CGRP positives. Ambdós vectors infectaven amb menys eficiència, neurones sensorials grans. Altres serotips d'AAV han mostrat també preferència per neurones petites de sistema nerviós perifèric (Towne *et al.*, 2009; Mason *et al.*, 2010).

Després d'observar un tropisme neuronal d'AAV1 i AAVrh10 en cultius organotípics de DRG, per caracteritzar el tropisme i l'eficiència de transducció *in vivo*, es van optimitzar els diferents sistemes d'injecció a SNP.

Es van administrar els dos vectors AAV1 i rh10 amb els diferents sistemes esmentats, però els resultats obtinguts variaven molt en funció de la via d'administració. Els sistemes més

ineficaços a l'hora de transduir un nombre significatiu de neurones van ser les vies d'administració intracoixinets i intramuscular. Amb aquestes tècniques vam aconseguir transduir molt poques neurones i amb baixos nivells d'expressió del transgen. Quan s'han utilitzat virus amb elevada capacitat de transport retrògrad com els HSV, aquest ha estat transportat retroaxonalment al llarg del nervi ciàtic fins als ganglis de l'arrel dorsal després de l'administració a coixinets. Els virus Adeno-associats sembla que no tenen una capacitat tan alta com els HSV per ser transportats retroaxonalment (Goss *et al.*, 2002). A més a més, l'administració de virus als coixinets està molt limitada pel volum que es pot injectar, en unes estructures tan petites. D'altra banda, en moltes malalties que afecten el SNP el transport retrògrad axonal està alterat, el que podria anular aquesta via d'entrada (Murakami *et al.*, 2001).

Recentment, els estudis de tropisme dirigits a transduir motoneurones es limiten a injeccions intramusculars. A ratolins adults, AAV1 i AAV8 intramuscular transdueixen específicament neurones sensorials i neurones motores (Hollis *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2010), però l'eficiència de transducció varia segons el vector. AAV1 s'expressa a la regió de ME pròxima al lloc d'injecció, en canvi, per AAV8 s'ha observat que també difon a la regió contralateral. AAV6 injectat via intramuscular a concentracions de $1.3 \cdot 10^{12}$ vg per animal, també té la capacitat de transportar-se retroaxonalment i transduir neurones motores de la regió lumbar pròxima al lloc d'injecció, observant una presència elevada de vg per cèl·lula de fins a 29 còpies (Towne *et al.*, 2010).

D'altra banda, s'ha vist que el transport retrògrad descrit per AAV2 a múscul de ratolins (Kaspar *et al.*, 2003) que es traduïa en expressió del transgen a motoneurones, gairebé no es detectava a rates, degut a un augment de la distància del nervi en aquests animals (10-20 cops superior la mida del ratolí) (Hollis *et al.*, 2008). Tot i així, a primats no humans s'ha comprovat que AAV6 quan s'injecta via intramuscular, té la capacitat de transportar-se retroaxonalment i transduir neurones motores de la regió lumbar pròxima al lloc d'injecció (Towne *et al.*, 2010). No obstant, els volums de virus utilitzats per aquesta via d'administració són molt grans, comparat amb altres vies com la injecció intratecal. El mateix succeeix amb l'administració intravenosa on, a més a més, el virus es distribueix a la major part dels teixits per la circulació sanguínia, el que podria tenir conseqüències a nivell de bioseguretat.

Quan s'injecten virus directament a ganglis dorsals és necessari realitzar tècniques de cirurgia complexes. Es realitza l'extracció de part de l'estructura vertebral entre les vèrtebres L4

i L5 i s'injecta el virus directament al gangli (Xu *et al.*, 2003). Els ganglis dorsals del nervi ciàtic a ratolí es troben precisament entre L4 i L6. És un procediment laboriós i invasiu i requereix un entrenament exhaustiu. Tot i que l'eficiència de transfecció de neurones sensorials és elevada respecte les altres vies d'administració, part del sistema nerviós s'exposa a possibles infeccions durant el procediment. També hi ha risc de causar dolor a aquest animals doncs la injecció en un òrgan tan petit, per molt fina que sigui l'agulla, pot causar lesió. Per altra banda el volum de virus que el gangli permet injectar també està molt limitat.

La injecció directe a nervi ciàtic és menys invasiva, la cirurgia del procediment no implica lesions traumàtiques per l'animal, únicament s'exposa una petita zona del nervi. L'eficiència de transducció és alta i els tipus de cèl·lules exposades és més ampli, pel que es pot assajar millor el tropisme dels vectors. Quan vam injectar AAV1 a nervi ciàtic, es va observar transducció tant de neurones sensorials com de cèl·lules de Schwann. Els marcatge de SC se centrava principalment al lloc d'injecció, en canvi, es va poder observar un petit percentatge de neurones marcades a DRG, entre un 2 i un 7%. La capacitat de transduir neurones observada per AAV1 podria donar una indicació de la capacitat d'aquest vector de transportar-se retrògradament al llarg dels axons. En estudis realitzats per Hollis *et al.*, mostren transducció a neurones motores i no en neurones sensorials (Hollis *et al.*, 2008), contràriament als resultats observats en el nostre treball, on no es va poder observar transducció de neurones motores però sí neurones sensorials. No podem descartar però que hi hagués alguna neurona motora transduïda però el percentatge era tan reduït que no es va caracteritzar el tropisme neuronal específic a neurones motores. Per altra banda, la transducció de neurones sensorials per injecció directe a gangli, coixinets o nervi ciàtic, està restringida a la regió que innerva el nervi ciàtic, localitzada al voltant de les vèrtebres lumbars (L3-5).

Paral·lelament es van injectar intra-nervi ciàtic els serotips AAV2 i AAV8 (Homs J *et al.*) (Annex I). Només es va observar tropisme neuronal amb AAV2 però amb un percentatge de transducció del 2-3% de neurones sensorials, per tant nivells més baixos que per AAV1. Amb AAV8, en canvi, vam observar tropisme preferencial per SC, i amb uns nivells gairebé nuls de transducció de neurones sensorials, el que podria ser degut a que els receptors d'AAV8 no es trobin presents als axons de les neurones sensorials, doncs hi ha un treball on sí que aconseguen marcar aquestes neurones per via intratecal (Storek *et al.*, 2008), o bé que AAV8 no pot aprofitar la maquinària cel·lular de retrotransport axonal per arribar al nucli de les neurones que innerven el ciàtic.

Per altra banda, quan es va injectar intraciàtic l'AAVrh10 es van observar nivells de transducció significativament més elevats que AAV1. Es van marcar específicament neurones de DRG amb un percentatge del 33% i no es va observar marcatge de cèl·lules de SC. Per tant AAVrh10 també presenta la capacitat de transportar-se fins al nucli de les neurones. També es va observar un cert marcatge a nivell de medul·la espinal, tot i que la transducció de neurones motores va ser molt baixa per aquesta via d'administració. La capacitat de transport retrògrad dels diferents AAVs en SNP no ha estat ben estudiada ni *in vivo* ni *in vitro*. Tampoc es coneixen els mecanismes pels quals la majoria dels AAVs entren a la cèl·lula i arriben al nucli on s'expressen. El coneixement d'aquests dos aspectes podria millorar els estudis sobre l'eficiència de transducció en molts teixits, entre ells el sistema nerviós perifèric.

Tanmateix hi ha certa controvèrsia referent a l'especificitat neuronal d'aquests vectors. L'estructura de la càpside i la interacció d'aquesta amb receptors específics determinarà l'entrada d'un AAV a cèl·lula, però en estudis realitzats per Klein et al. han vist que el sistema de producció dels vectors virals pot influir en el tropisme d'aquest. Analitzant el tropisme dels rAAV8, 9, rh10 i rh43 a SNC, purificats mitjançant gradients de clorur de cesi (CsCl) o iodixanol, van observar que el sistema de purificació afectava sobretot a rAAV8. Aquest vector presentava un tropisme diferencial en funció del sistema de purificació, transduïnt majoritàriament astròcits quan es purificava amb CsCl, i variant el tropisme, transduïnt específicament neurones quan es purificava amb iodixanol. La presència d'impureses en el procés de purificació amb CsCl podria influir en la interacció AAV-cèl·lula diana (Klein *et al.*, 2008). Nosaltres vam comprovar si aquest tropisme diferencial també s'observava a SNP. Vam administrar AAV8GFP purificat amb CsCl i amb iodixanol intraciàtic i es va quantificar el mRNA del gen codificat pel vector nervi ciàtic i a DRG (Homs J *et al.*) (Annex I). Es va observar un tropisme preferencial per SC tant amb AAV8-CsCl com amb AAV8-Iodixanol, amb nivells d'expressió a SC més elevats per AAV8-CsCl. A més a més, no es van obtenir nivells de transducció elevats de DRG amb cap dels dos vectors, per tant el tropisme d'AAV8 a SNP via intraciàtic seria independent del mètode de purificació utilitzat, al menys a les nostres mans on pot ser que la quantitat d'impureses de les nostres preparacions siguin menors que les utilitzades per Klein et al. De totes maneres, a partir d'aquests estudis vam utilitzar tots els vectors purificats per gradient d'iodixanol.

Finalitzats els estudis de tropisme intraciàtic amb els serotips AAV1, 2 i 8, es van continuar els estudis de caracterització a SNP només amb el serotip AAV1, optimitzant

l'administració intratecal d'aquest vector i realitzant estudis de l'estabilitat *in vivo* al llarg del temps. Per últim, es va decidir utilitzar AAV1 com a vector de teràpia gènica en un model murí per neuropatia diabètica. Va ser aleshores quan es va descriure el serotip rh10, un nou serotip derivat de monos, que presentava transducció específica a neurones a SNC, i vam decidir caracteritzar el tropisme d'aquest serotip a SNP realitzant els mateixos estudis duts a terme amb AAV1.

Un altre sistema utilitzat per transduir SNP és la injecció directe a líquid cefaloraquidi (Wang *et al.*, 2005a). Aquesta via d'administració pot provocar problemes osmòtics transitoris a sistema nerviós, tanmateix és un sistema àmpliament utilitzat en clínica per administrar fàrmacs via peridural. És molt més eficient que la injecció a ganglis i menys invasiu. Encara que el virus es dilueix en el líquid cefaloraquidi i per tant la concentració local a nivell de gangli dorsal no és tan elevada com quan s'injecta directament al gangli, s'aconsegueixen nivells de transducció elevats i permetria transduir més àmpliament el SNP de cara a tractar una malaltia sistèmica com la neuropatia diabètica. A més a més, l'administració del virus queda confinada en una estructura més aïllada, per tant la transducció de teixits perifèrics està més limitada i en canvi la concentració de virus dins el LCR és més elevada i per tant caldria administrar menys partícules virals per individu.

La injecció intratecal ens va permetre transduir no només els ganglis lumbar que innerven el nervi ciàtic si no també els DRG de les diferents regions de la medul·la espinal. Els resultats obtinguts per AAV1 mostren que aquest vector transdueix específicament neurones sensorials a tota la regió lumbar. Els nivells de transducció amb AAVrh10 eren significativament més elevats, aconseguint marcatge tant a cèl·lules de la regió lumbar com toràcica i cervical, encara que els nivells d'expressió del transgèn disminuïen en funció de la distància del lloc d'injecció. Per ambdós vectors, mitjançant immunohistoquímica, vam observar marcatge a neurones sensorials grans i petites. El líquid cefaloraquidi que conté el vector viral també banya l'encèfal. En algun cas, la transducció de neurones del cervell podria ser perjudicial pel pacient, depenent del tipus de gen terapèutic que s'estigui administrant. Per això, vam realitzar seccions de l'encèfal i vam observar els diferents talls al microscopi de fluorescència. En els talls observats només vam detectar 1-2 cèl·lules GFP positives al voltant dels ventricles laterals en algunes seccions. De totes maneres caldria fer un estudi més exhaustiu per descartar la transducció dels SNC amb aquest sistema. De fet, a la bibliografia tampoc hi ha dades concloents sobre la biodistribució dels vectors a SNC quan s'administren a LCR, ni amb ratolins ni amb primats no humans (Storek *et al.*, 2008).

Amb AAVrh10 es van observar nivells de transducció més elevats i amb un marcatge preferencial per neurones sensorials petites, principalment neurones peptidèrgiques (CGRP+), tal i com havíem observat per administració intraciàtic i en els estudis amb cultius organotípics. D'altra banda, també vam transduir els DRG de la regió contralateral del lloc d'injecció probablement degut a que el LCR banya tota la regió, fet que no s'observava amb la injecció intraciàtic, on només es transduïen neurones dels DRG innervades per aquest nervi.

És important remarcar que també es va observar transducció de neurones motores amb el vector AAVrh10, transduïnt neurones al llarg de la medul·la espinal amb una elevada eficiència entre el 35-40%. Es van realitzar assajos d'immunohistoquímica per caracteritzar el tropisme d'AAVrh10 a medul·la espinal i es va observar que les neurones marcades amb GFP també eren positives per ChAT, marcador de neurones motores. En alguna secció aïllada també es va observar algun marcatge esporàdic d'oligodendròcits (APC1+). El marcatge de neurones GFP+ a la regió ventral de la medul·la espinal es va observar també a la regió contralateral de lloc d'injecció, resultats també observats en DRG, però amb un nombre de neurones marcades més baix que els observats a les regions pròximes al lloc d'injecció, entre un 20-25% neurones motores.

Recentment s'ha reportat la capacitat d'AAV9 d'infectar cèl·lules de sistema nerviós central, quan s'injecta via sistèmica en ratolins nounat i adults (Foust *et al.*, 2009). En ratolins nounats pot infectar tant neurones com glia i en adults només glia. Els autors de l'estudi suggereixen que en adults és l'únic serotip que té la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica i transduir astròcits via receptors específics presents en cèl·lules endotelials, estretament relacionades amb els astròcits, que formen els peus astrocitaris perivasculars, importants per mantenir aïllat el líquid cefaloraquídi de la circulació general. Com hem comentat anteriorment, en ratolins nounats la barrera hematoencefàlica (BH) encara no està ben definida i per aquesta raó facilitaria l'entrada del virus a neurones motores. Sorprenentment, estudis realitzats per Duque *et al.* observen el 28% de neurones motores transduïdes en animals adults, quan injecten AAV9 intravenós. Els autors consideren que AAV9 té la capacitat de difondre de la circulació general al parènquima nerviós, mitjançant la interacció de la càpside d'AAV9 amb receptors específics presents a cèl·lules endotelials com el receptor de laminina (Duque *et al.*, 2009).

Per AAVrh10 s'ha descrit la capacitat d'infectar neurones quan s'injecta a cervell i difondre del lloc d'injecció, però fins ara no s'ha reportat la capacitat de travessar la barrera

hematoencefàlica (Passini *et al.*, 2003; Cearley and Wolfe, 2006; Levites *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2008; Foust *et al.*, 2009). Nosaltres observem transducció de neurones sensorials i motores però no hem observat interneurons. Hipotetitzem que la via d'administració intratecal introdueix el vector a líquid cefaloraquidi permetent que AAVrh10 transdueixi els axons de neurones motores, que es localitzen a l'arrel ventral de la medul·la espinal exposats a líquid cefaloraquidi, i transportar-se fins al soma de la neurona mitjançant transport retrògrad. Fins ara no s'ha descrit si AAVrh10 presenta la capacitat de travessar la BH, seria interessant caracteritzar el tropisme d'aquest vector administrant-lo per via intravenosa. Tanmateix pensem que és important confinar el vector en l'espai que es pretén transduir, per augmentar la bioseguretat de l'administració. D'aquesta manera també el virus resta més concentrat i les dosis d'AAV necessàries per una transducció adequada són molt menors.

Es va quantificar l'estabilitat d'AAV1 i AAVrh10 a sistema nerviós perifèric després de l'administració intratecal dels vectors. Vam observar que els nivells d'expressió disminuïen lleugerament amb el temps. AAV1 presentava un pic d'expressió a setmana 3 després de la injecció, en canvi, AAVrh10 presentava un pic d'expressió del transgen a setmana 1 que es mantenia fins a setmana 6 i a setmana 10, l'últim temps analitzat, disminuïa.

Hi ha diverses explicacions per aquest fenomen. Una d'elles és el desenvolupament de resposta immunològica contra les cèl·lules infectades o contra els vectors. La presència d'anticossos neutralitzants pot significar una barrera important per l'eficiència de transducció dels AAV, fins i tot, emmascarar la veritable eficiència real de vector viral. L'activació de la resposta humoral i cel·lular contra el transgen, en ocasions, pot ser la causa de la disminució de l'expressió del transgen.

En un assaig clínic en humans realitzat amb un vector AAV recombinant pel tractament de l'hemofília B, es va injectar el vector rAAV2 codificant per el factor IX de la coagulació, a múscul i a l'artèria hepàtica, i no es va observar un increment del Factor IX en circulació. A més quan s'injectava a l'artèria hepàtica, transduïa fetge però l'expressió del transgen disminuïa amb el temps. La causa de la baixa expressió del Factor IX va ser deguda a una resposta immunològica cap a aquest vector viral, no observada en estudis previs en ratolins i gossos. (Hasbrouck and High, 2008).

La bioactivitat dels AAV la determina principalment la càpside, que és el primer que interacciona amb la cèl·lula hoste. La utilització de serotips alternatius, creats a partir de

modificacions de regions específiques de la càpside dels diferents AAVs, permetria ampliar l'eficiència biològica dels AAV com a vectors de teràpia gènica, augmentant l'eficiència de transducció d'aquests virus a teixits determinats, alterant el tropisme i sobretot evitant una resposta humoral i/o cel·lular (McCarty *et al.*, 2004). Els serotips i variants poden servir com a model per dissenyar càpsides específiques de teixit, aquests constructes servrien per ampliar i completar el rang actual dels vectors adeno-associats (Vandenberghe *et al.*, 2009).

En el nostre treball, hem quantificat els nivells d'anticossos neutralitzants circulants en els animals injectats a intratecal amb AAV1 i AAVrh10. Es va observar una inhibició del 100% de l'expressió d'AAV1 a concentracions decreixents de sèrum de ratolins immunitzats per aquest vector, en canvi, el nombre d'anticossos neutralitzants generats contra AAVrh10 era molt menor que AAV1, ja que ens permetia obtenir nivells d'infecció del 100% a una dilució 1/50 del sèrum immunitzat.

Sembla haver-hi evidències que l'activació de la resposta immunològica de la cèl·lula hoste per part dels AAVs i altres virus, vindria donada per la seva capacitat d'infectar cèl·lules dendrítiques, via receptors heparan-sulfat. Wilson et al. han realitzat estudis en ratolins i primats (macacs), on administren diferents vectors AAV: rAAV2, 7 i 8 mitjançant injecció intramuscular, observen que l'activació de la resposta immunològica, activació de les cèl·lules T, no és deguda ni a la càpside del virus, ni a la dosi administrada, ni al sistema de producció del vector viral, i no s'observa correlació entre l'activació de la resposta immune deguda a la càpside i la resposta generada per l'expressió del transgen. Conclouen que l'activació de les cèl·lules T depèn de la presència de llocs unió a heparina presents a la càpside dels vectors virals, per tant virions deficients per llocs d'unio a heparina no activen la resposta immune i presenten nivells de transducció elevats. S'ha demostrat recentment que AAV1 també és capaç d'infectar cèl·lules dendrítiques (Brantly *et al.*, 2009), a diferència d'AAV8. Per administració intracèl·lular comparant AAV1 i AAV8 vam comprovar que AAV1 generava molts més anticossos neutralitzants que AAV8. Seria interessant estudiar si AAVrh10 és capaç d'infectar cèl·lules dendrítiques. Tanmateix veiem una disminució de l'expressió d'AAVrh10 a setmana 10 que no veiem amb AAV1. Tal i com es comenta als resultats, podria ser deguda a la variabilitat de l'experiment i caldria augmentar la *n* en aquest últim punt. En estudis realitzats amb AAV1, 2, 5, 6 i 8 per injecció directa a gangli veuen una disminució de l'estabilitat d'AAV6 únicament, acompanyat d'infiltració a setmana 12 post-injecció. Nosaltres no veiem una resposta cel·lular pel que

ensem que probablement és un problema tècnic a l'hora d'injectar els 2 animals que es van sacrificar a setmana 10.

En el SNC, un òrgan relativament immunoprotegit, els AAVs es mantenen al llarg de tota la vida de l'animal. Una altra explicació per la disminució de l'expressió del transgen al llarg del temps en DRG i ME dels ratolins injectats amb AAV1 i AAVrh10 podria ser una disminució del nombre de còpies de DNA per cèl·lula transduïda. De fet, està descrit que en teixits com el fetge o el ronyó, entre d'altres, AAV8 passa de tenir més de 50 còpies de genoma viral per cèl·lula als 3 dies, a 1 còpia o menys per cèl·lula als 2 mesos. En canvi, en teixit muscular aquest serotip sembla més estable, doncs l'expressió del transgen augmenta entre 3 dies i dues setmanes, per mantenir-se durant mesos (Wang *et al.*, 2005b). Amb AAVrh10 vam quantificar el nombre de vg/cèl a les diferents regions de la medul·la espinal i a DRG i no veiem una davallada de DNA viral/cèl·lula, tot i que hi ha una gran variabilitat.

Un punt limitant en l'eficiència de transducció dels vectors recombinants d'AAV de cadena senzilla (ssAAV) és que aquests vectors requereixen de mecanismes cel·lulars per sintetitzar la cadena complementària del DNA. Aquest pas exposa els genomes virals a ser degradats per DNAses de la cèl·lula hoste i en conseqüència la disminució de l'expressió del transgen. Els genomes virals de cadena complementària (scDNA) agilitzen el procés d'expressió del transgen perquè no necessiten sintetitzar la cadena complementària, fet que els permet expressar el transgen més eficientment. En estudis realitzat amb diferents pseudotips d'AAV s'ha observat que els AAVsc presenten uns nivells de transducció més elevats comparats amb els ssDNA i s'expressen abans (Storek *et al.*, 2006; Hollis *et al.*, 2008).

Tot i així, els vectors scAAV tenen un punt limitant que és la capacitat del genoma viral, que es veu disminuïda a la meitat respecte els vectors ssAAV. Aquest fet dificulta la utilització de seqüències reguladores de mida gran que ajuden a augmentar els nivells d'expressió del transgen. En aquest punt del treball vam voler comparar els nivells de transducció i d'expressió de dos AAVrh10, un ss amb un promotor més fort (CAG) i una seqüència estabilitzadora de mRNA (WPRE), seqüència que podríem encapsidar-les en un vector ss, però que no ens cabrien en un sc, i un vector sc amb un promotor una mica menys fort (CMV), però tot i això molt potent.

A nivell de DNA vam veure que tal i com estava descrit, l'AAV sc augmentava els nivells de transducció a setmana 1, però després a temps més llargs no veiem diferències estadísticament significatives, tot i que el nombre de vg/cèl·lula sempre és més alt amb AAVsc. A nivell d'expressió no vam veure diferències estadísticament significatives amb els dos vectors.

A LCR també veiem un nombre lleugerament disminuït amb AAVrh10ss que amb el sc en els diferents temps analitzats.

PART II: TERÀPIA GÈNICA PER NEUROPATIA DIABÈTICA UTILITZANT AAVs QUE CODIFIQUEN PER IGF-I

La neuropatia diabètica és una complicació de la diabetis que afecta tant a components sensorimotors com autònoms del SNP. La polineuropatia sensorimotora que es desenvolupa en pacients diabètics és la neuropatia perifèrica més comú i afecta en major i menor grau a tots els tipus de fibres nervioses. La percepció sensorial anormal dels pacients diabètics inclou la pèrdua de la sensació de dolor i temperatura, així com la sensació de cremor i hiperetèsia cutània, afectant típicament els peus i la part inferior de les cames, progressant cap a mans i braços. En estadis més avançats apareixen úlceres en els peus i deformitat neuropàtica, el que finalment ocasiona el 40% de les amputacions no-traumàtiques de les extremitats. Els estudis en pacients diabètics que presenten neuropatia no estan ben estandaritzats i existeix una gran variabilitat entre les proves fisiològiques, per determinar si existeix patologia i en quin tipus de fibres. En general, els símptomes electrofisiològics es caracteritzen per una disminució de la velocitat de conducció nerviosa (NCV) i anomalies en els potencials d'acció compostos del múscul (CMAP) (Aguilar-Rebolledo, 2005).

Les fibres nervioses afectades són molt diferents depenent del pacient, pel que és difícil definir un barem per unificar els estudis epidemiològics de la neuropatia diabètica que depèn a més a més del tipus de població estudiada i de la durada de la diabetis. Per aquest motiu, la prevalència de la neuropatia diabètica sensorimotora varia entre 20 i 50% entre els diferents grups de pacients diabètics i té una incidència del 2% anual, essent la complicació de la diabetis que ocasiona la majoria de les hospitalitzacions, amb el conseqüent cost tant per la sanitat com per la qualitat de vida dels pacients (Shaw *et al.*, 1999). Malgrat el tractament amb insulina o fins i tot del transplantament de pàncrees, no s'ha aconseguit revertir la progressió de la neuropatia diabètica, el que indica que es necessita un tractament específic per aquesta patologia del SNP a etapes inicials del desenvolupament de la diabetis (Navarro *et al.*, 1997).

Un bon model animal per neuropatia diabètica ha d'intentar reproduir la patologia del pacients humans que pateixen diabetis. Els requisits més notables que ha de complir són: la pèrdua de sensibilitat a nivell de les extremitats, una alteració de les mesures electrofisiològiques del nervi i per últim evidències anatòmiques de pèrdua de fibres nervioses.

Un dels models murins més utilitzats per l'estudi de la DM I és aquell al qual se li ha induït la diabetis mitjançant *streptozotocina* (STZ), 2-deoxi-2-(3-methyl-3nitrosourea)1-Dglucopiranos; un antibiòtic d'ampli espectre produït pel microorganisme *Streptomyces achromagenes*, que actua sobre les cèl·lules β del pàncrees. La STZ entra a les cèl·lules β mitjançant el transportador de membrana GLUT-2 (Schneidl *et al.*, 1994; Wang and Gleichmann, 1998). Un cop dins la cèl·lula produeix un efecte tòxic per tres mecanismes: metil·lació del DNA, generació de radicals lliures i producció d'òxid nítric (NO), provocant la mort cel·lular. La pèrdua de les cèl·lules β del pàncrees d'aquests animals suposa una alteració en la regulació dels nivells de glucosa en sang, per la falta de síntesi d'insulina. Mitjançant aquest sistema podem obtenir models murins de diabetis tipus I amb simptomatologia i patologia semblant als humans, tot i que, generalment els models murins de diabetis no sobreviuen el temps necessari per desenvolupar complicacions com la neuropatia perifèrica.

Actualment s'utilitzen dos procediments d'administració de la *streptozotocina*, l'administració d'una única dosi elevada de STZ a una concentració de 160 mg/kg, mitjançant la qual s'aconsegueix una ràpida destrucció de les cèl·lules β per acció citotòxica directa, i una pèrdua del 90% del contingut pancreàtic d'insulina, provocant hiperglucèmia, o mitjançant múltiples dosis de STZ a baixa concentració (40-60 mg/kg per injecció durant 5 dies consecutius). Està descrit que injeccions consecutives de STZ a baixa dosi generalment esdevé amb una resposta inflamatòria contra les cèl·lules β , amb infiltració limfocitària provocant insulinitis, més semblant a la diabetis autoimmune (Eisenbarth, 1986).

En la soca C57B1/Kjs i la colònia CD1 s'ha observat una major predisposició a desenvolupar insulinitis després de l'administració de STZ que no les soques BALB/c, C57B1/SJL i SBA/2J (Rossini *et al.*, 1977). En estudis realitzats per K.A. Sullivan et al. 2007 on comparen dos models, un d'ells amb diabetis induïda per STZ (C57BL/6J) i un altre model que desenvolupa espontàniament diabetis ((B6Ind2^{Akita}), (aquest model presenta una mutació espontània al locus *Ins2*, que li provoca deficiències en la secreció d'insulina), després de realitzar diferents estudis electrofisiològics, arriben a la conclusió que cap dels dos models és capaç de desenvolupar neuropatia diabètica, tot i la persistent hiperglucèmia que presenten (Sullivan *et al.*, 2007). No obstant, hi ha estudis on sí s'observen alteracions electrofisiològiques tant sensorial com motora, en ratolins amb diabetis tipus 1 induïda, (Tam *et al.*, 2004; Kennedy and Zochodne, 2005; Obrosova *et al.*, 2005).

L'any 1974 als laboratoris de Shinogi Research d'Osaka van obtenir una soca de ratolins NOD (*Non-obese Diabetic mice*), a partir de la sublínia de ratolins Jc1-ICR. Els ratolins NOD tenen la capacitat de desenvolupar diabetis espontàniament quan són criats en estabularis lliures de patògens. Generalment la desenvolupen un 80% de les femelles i un 20% dels mascles. Els NOD presenten hipoinsulinèmia, hiperglucèmia i glucosúria, entre les 12 i 14 setmanes d'edat, i la incidència de la diabetis varia en funció de les condicions ambientals. L'administració de STZ al model NOD s'ha usat per sincronitzar el desenvolupament de la DM I en la colònia, que és molt variable entre els diferents individus. En estudis patològics, a nivell de sistema nerviós realitzats en aquest model murí de diabetis, s'ha observat que principalment presenta neuropatia diabètica gastrointestinal (Schmidt *et al.*, 2003). Aquests ratolins desenvolupen neuropatia diabètica perifèrica semblant als ICR (Homs J *et al.*) (Annex II).

Per a DM tipus II generalment els models murins utilitzats són aquells que esdevenen diabètics espontàniament en edat adulta, i que depenent de la soca requereix un manteniment constant d'una dieta rica en greixos com el model db/db. Estudis realitzats amb models murins de diabetis tipus 2 ob/ob i db/db, s'ha observat que presenten la capacitat de desenvolupar neuropatia diabètica, presentant alteració de la velocitat de conducció nerviosa tant motora com sensorial (Drel *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2007).

La diabetis afecta a la regeneració del nervi perifèric, però es desconeix el grau d'afectació, la progressió i la selectivitat. La combinació de diabetis induïda i lesió a nervi perifèric ens permet observar les alteracions fisiopatològiques associades a neuropatia diabètica. En estudis realitzats per Kennedy i Zochodne, on combinaven diabetis i lesió en un model murí van observar que 4 setmanes després de la lesió, presentaven una disminució del 10% la velocitat de conducció motora i un retard en la regeneració i reinnervació de fibres nervioses a múscul del 15% en els animals diabètics amb *crush*, respecte els control. A més a més, van observar alentiment en el creixement i maduració de les fibres en regeneració, a la regió distal de la lesió, provocant a una disminució del 15% del diàmetre axonal i un 25% del nombre de fibres, en els animals diabètics (Kennedy and Zochodne, 2000).

En el present treball es van generar genomes virals de vectors Adeno-associats AAV1 i AAVrh10 que codificaven per el factor de creixement IGF-I. Els animals ICR van ser tractats amb STZ (5 x 45mg/Kg) per tal d'induir la diabetis experimental juntament amb la lesió *crush* i van ser injectats amb el vector viral corresponent. En primer lloc es va analitzar per

immunohistoquímica el nivells d'expressió de IGF-I a ganglis de l'arrel dorsal i a medul·la espinal dels animals transduïts. Es va observar un augment de IGF-I a ganglis dels animals transduïts amb IGF-I respecte els controls. Concordant amb els resultats obtinguts en la caracterització del tropisme, quan es va administrar intratecal AAVrh10IGF-I, aquest vector també presentava nivells de transducció més elevats que AAV1IGF-I. A més a més, i d'acord amb els estudis de tropisme d'AAVrh10 quan es van analitzar els nivells d'expressió de IGF-I, es va observar també un augment de l'expressió de IGF-I a neurones motores dels animals transduïts amb AAVrh10 respecte els controls.

IGF-I és un factor neurotròfic de secreció, que estimula la proliferació i supervivència cel·lular. Una disminució dels nivells circulants de IGF-I s'associa amb diabetis tipus 1, però s'ha observat que la baixada gradual dels nivells de IGF-I en sèrum es produeix també amb l'edat. A sistema nerviós central s'associa amb l'acumulació de plaques β -amiloide a cervell, quelcom que succeeix en pacients de la malaltia d'Alzheimer (Carro *et al.*, 2002).

L'administració intratecal d'AAV-IGF-I permet transduir un nombre de neurones molt superior que si s'administra el vector per altres vies com intracèl·lular o intramuscular. A més, IGF-I és un factor de creixement que és secretat per les cèl·lules que el produeixen. Així, les arrels dels nervis espinals que són elements de transició entre el SNP i el SNC, estan envoltades pel líquid cefaloraquídi. Ben segur que els virus poden accedir a les neurones sensorials i motores per les arrels, a través del LCR i migrar fins al nucli de les neurones per transport retrògrad axonal. De la mateixa manera, IGF-I podrà ser alliberat a LCR a través de les arrels de les neurones transduïdes i arribar a altres cèl·lules no transduïdes. Mitjançant ELISA es van analitzar els nivells de IGF-I a LCR. Els nivells de IGF-I eren significativament superiors en els animals transduïts amb AAVrh10IGF-I respecte els controls i als animals injectats amb AAV1IGF-I. Tot i que AAV1-IGF-I també presentava nivells elevats de proteïna IGF-I a LCR, aquests no eren significatius respecte els nivells obtinguts amb els animals control. No obstant, la presència d'AAV1-IGF-I també augmenta els nivells de la proteïna a LCR.

A líquid cefaloraquídi també hi són presents les proteïnes d'unió a IGF-I (IGFBP), aquestes regulen la bioactivitat de IGF-I, regulant la seva disponibilitat a receptor. La principal via de supervivència cel·lular és IGF-I / IGF-IR, no obstant no és l'únic mecanisme mitjançant el qual, el sistema IGF-I pot regular la supervivència cel·lular. La presència de les proteïnes d'unió d'alta afinitat a IGF modulen la disponibilitat d'aquest al receptor, però també per sí soles poden

influir en la supervivència cel·lular. La proteïna més abundant en circulació és IGFBP-3 (Katz *et al.*, 1995), aquesta unió ternària entre IGF i IGFBP permet augmentar la vida mitja de IGF de 20-30 minuts a 15 hores, a més també s'evita la reacció creuada de IGF amb el receptor de la insulina. Predominantment IGFBP1 s'expressa a fetge i les altres IGFBP s'expressen en varis teixits, incloent sistema nerviós central en condicions fisiològiques (Walter *et al.*, 1999). Funcionalment les IGFBP 4 i 6 es consideren inhibidores, i que IGFBP 1, 2, 3 i 5 poden tenir efecte inhibidor o potenciador en funció del tipus cel·lular on actuen. Tot i així també s'ha observat que poden presentar efectes biològics independents de lligant (IGF). IGFBP1 s'uneix a integrines (motilitat cel·lular) i IGFBP3 inhibeix el creixement cel·lular en cèl·lules deficientes en IGF i IGFIR (Butt and Williams, 2001). En models *in vitro* i *in vivo* de la malaltia de Huntington i Parkinson, IGF-I circulat s'uneix a proteases d'unió a IGF-I presents a sèrum, aquestes proteases s'uneixen a l'extrem N-terminal de IGF-I generant un tripèptid, format per els aminoàcids glicina, prolina i glutamina (Gly-Pro-Glu). La manca del tripèptid de la regió N-Terminal de IGF-I, disminueix l'afinitat de IGF-I per les IGFBP i augmenta l'afinitat de IGF-I pel receptor, aquest fet suposa un augment de la capacitat neuroprotectora i neurotròfica de IGF-I (Hobba *et al.*, 1996). En rates diabètiques s'ha vist una disminució de IGFBP3 circulat i un augment de IGFBP1 (De La Puente *et al.*, 2000). Les proteïnes d'unió a IGF-I circulants regulen la disponibilitat d'IGF-I a LCR, per tant regulen els nivells de IGF a LCR (Pan and Kastin, 2000). En aquest estudi no hem quantificat els IGFBP però és quelcom que tenim previst fer.

Per altra banda es van analitzar els nivells de mRNA d'IGF-I a ganglis transduïts, on vam poder observar un augment d'IGF-I tant per AAV1IGF-I com per AAVrh10IGF-I, amb uns nivells d'expressió gairebé 80 vegades els nivells observats pels control. Quan comparem els *Ct* obtinguts per qPCR amb el mRNA d'IGF-I per AAV1 i per AAV10 en les potes intactes s'observen diferències significatives (* $p < 0,05$), amb nivells de mRNA lleugerament superiors per AAV1 IGF-I, el que podria ser degut a que el vector AAV1 transdueix únicament DRG mentre que el AAV10 es reparteix entre els DRG i la medul·la espinal. D'altra banda, el nombre total de vg utilitzats era lleugerament superior per AAV1, ja que es tractava d'una preparació més concentrada ($8,3 \cdot 10^{10}$ vg per AAV1 i $6 \cdot 10^{10}$ vg per AAVrh10). També es va analitzar els nivells de mRNA d'IGF-I a ME i vam observar que hi havia un augment significatiu de mRNA d'IGF-I en els animals transduïts amb AAVrh10 IGF-I. Per AAV1IGF-I no es va quantificar la presència de IGF-I a ME, per què en estudis de tropisme ja havíem vist que aquest vector no transduïa neurones motores quan s'injectava via intratecal.

La resposta d'IGF-I es produeix via receptor d'IGF-I, l'activació del receptor i la conseqüent activació de diferents vies de senyalització (Akt/PI3K i MAPK), promouen un seguit de canvis en els nivells d'expressió de factors de transcripció i factors anti-apoptòtics, que esdevenen amb la supervivència cel·lular. Quan la via de senyalització d'IGF-IR es veu afectada tant per uns nivells d'expressió baixos del receptor com per la inhibició d'aquest, mitjançant citoquines inflamatòries, la funció i la supervivència neuronal es veu compromesa (Liu *et al.*, 1993). La diabetis altera el metabolisme cel·lular generant un augment de l'estrès oxidatiu cel·lular i en conseqüència s'inhibeixen vies de supervivència cel·lular com PI3K/Akt i s'activen vies de senyalització apoptòtiques, causant dany al DNA cel·lular i fins i tot la mort cel·lular.

Vuit setmanes després de la inducció de la diabetis i un mes després de l'administració del vector amb IGF-I es va observar que la via de senyalització d'Akt es trobava augmentada significativament en DRG transduïts amb AAVrh10. S'ha descrit que IGF-I és un potent inductor de l'expressió de VEGF (Punglia *et al.*, 1997) a través de l'activació de HIF-1 α (*Hipoxia-inducible factor 1*), mediada en part, per l'activació de la via de senyalització d'Akt (Semenza, 2002). En els nostres resultats es va observar que l'augment de l'expressió de VEGF eren proporcionals a l'activació d'Akt-P en els animals transduïts amb AAVrh10IGF-I. Amb el vector AAV1IGF-I no es van observar canvis significatius en la fosforilació d'Akt ni en els nivells d'expressió de VEGF, tot i l'augment d'IGF-I a DRG.

S'ha descrit el poder neurotròfic de VEGF. L'efecte d'activació de la supervivència de neurones sensorials que té IGF-I podria estar mediat, en part per l'activació de factors neurotròfics com VEGF, que veiem alterada la seva expressió en diabetis (Chiarelli *et al.*, 2000).

Seria interessant realitzar un estudi més detallat de les vies de senyalització afectades en diabetis, és a dir, analitzar quin efecte genera un augment d'IGF-I en els diferents tipus de neurones sensorials, ja que l'afectació de la diabetis varia en funció del tipus de neurona, analitzant l'expressió de factors de transcripció implicats tant en supervivència cel·lular (FoxO1 i FoxO3) com en apoptosi (JNK/MAPKp38) i també quantificar l'expressió de mRNA de pèptids com CGRP, substància P i receptors com Trk, específics per cada tipus cel·lular de DRG (Adeghate *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2008).

Les neurones del SNP tenen la capacitat de mantenir i regenerar els seus axons dins d'un ambient de creixement permissiu. L'èxit de la regeneració depèn en gran part del manteniment

de la membrana basal i de l'eliminació eficient dels desfets d'axons i mielina degenerats per part dels macròfags recrutats en la degeneració walleriana. També depèn de l'expressió de factors neurotròfics que duen a terme les SC i una regulació del programa de creixement de les neurones. Els procés de regeneració està ben caracteritzat per la degeneració walleriana seguit de la degeneració axonal, fins a la formació del conus de regeneració i creixement axonal fins arribar al destí corresponent, i com a últim pas recuperar la velocitat de conducció nerviosa sensorial i motora.

L'inici i el manteniment del conus de creixement actiu durant la regeneració del nervi perifèric, suposa l'actuació de molts aspectes del desenvolupament neuronal i s'aconsegueix a través de l'activació de vies de senyalització complexes, on es tan implicats varis receptors, canals, vies de senyalització citoplasmàtica i la transcripció i traducció de gens (Kim *et al.*, 2006).

Un cop comprovada la transducció de SNP amb AAV1 i AAVrh10, ens vam centrar en estudiar la capacitat regenerativa d'IGF-I, en un model murí que combina diabetis induïda amb STZ i lesió a nervi ciàtic (*crush*).

Inicialment es van quantificar els nivells de mRNA d'IGF-I a DRG de la pota lesionada. Aquests també es transdueixen eficientment per AAV1IGF-I i AAVrh10IGF-I. Tant per AAV1 com per AAVrh10 es va observar un augment significatiu dels nivells de mRNA d'IGF-I respecte els animals controls. Cal remarcar que en valors relatius, l'expressió dels dos vectors a DRG de la pota lesionada són inferiors respecte als de DRG de la pota intacte. Aquesta diferència pot ser deguda a que augmenta l'expressió d'IGF-I a les potes control quan es produeix lesió, pel que els factors relatius disminueixen.

A més, en condicions de lesió es produeixen canvis a nivell molecular i fisiològic de la neurona que alteren l'expressió de receptors, factors de transcripció i es genera una resposta immune al lloc de la lesió i en regions pròximes, que poden dificultar la infecció de les neurones per part dels AAVs i en conseqüència disminuir els nivells d'expressió del transgen. Aquest fet també s'observa a medul·la espinal de ratolins tractats amb AAVrh10IGF-I on els nivells d'expressió relatius són menors per la regió de ME de la pota lesionada que la regió de la pota intacte, encara que les diferències no són estadísticament significatives.

Els canvis provocats per la lesió no influïrien tant en la capacitat d'infecció del virus en aquesta regió. Seria interessant avaluar els nivells d'expressió del transgen si l'administració del vector terapèutic es realitzés transcorregudes unes hores i fins i tot dies després de la lesió, per comparar si el fet d'administrar el vector al mateix moment de la lesió influeix en els nivells d'expressió.

L'increment en els nivells d'expressió de mRNA d'IGF-I, a neurones sensorials (AAV1 i AAVrh10) i a ME (AAVrh10) suposa una activació de la transcripció i traducció de la proteïna GAP43. Aquesta, és una proteïna essencial per la correcta formació i progressió del conus de creixement en neurones en regeneració. En condicions normals s'expressa en neurones sensorials petites però en lesió de nervi perifèric s'expressa en els diferents tipus de neurones sensorials i també en neurones motores (Xu *et al.*, 2008).

No obstant, quan es produeix lesió en nervi perifèric, augmenten els nivells de la proteïna GAP43 per activar la regeneració de les fibres lesionades, tanmateix l'expressió de GAP43 en animals control no és tant elevada com en els animals tractats amb IGF-I, la qual cosa indica que la transferència gènica d'IGF-I és capaç d'accelerar el procés de regeneració, que es veu retardat en diabetis (Zochodne, 2000b).

S'ha relacionat que un augment d'IGF-I a nervi perifèric actua a nivell de les cèl·lules de Schwann promovent la seva supervivència, proliferació i mielinització. La presència d'IGF-I a les regions distal i proximal de la lesió activa la transcripció de gens mielinitzants en les SC. En el nostre grup s'han caracteritzat les alteracions en els nivells d'expressió de les proteïnes de la mielina en diabetis (Ariza, 2010). Es va observar un augment de l'expressió de gens mielinitzants a nervi ciàtic lesionat en ratolins tractats amb AAV1IGF-I. Els nivells de mRNA pels diferents gens mielinitzants analitzats eren superiors en els animals tractats respecte els control, però no s'observava un augment d'expressió estadísticament significativa degut a la variabilitat en l'eficiència de transducció per AAV1IGF-I, dins del grup dels animals tractats. Tot i així, els nivells d'expressió relatius pels diferents gens mielinitzants, principalment P0 i PMP22, eren entre 5 i 7 vegades superiors als dels animals control.

En canvi, sí que es van observar diferències significatives per AAVrh10IGF-I en els nivells d'expressió dels mRNA dels diferents gens mielinitzants analitzats (P0, PMP22, MBP i MAG) a nervi ciàtic lesionat dels animals tractats respecte els control. Amb uns nivells d'mRNA d'IGF-I

unes 20 vegades superior per P0, entre 10 i 12 vegades superiors per PMP22 i MAG, i amb menys quantitat per MBP, on els detectava un augment de 2 vegades per sobre els nivells dels animals control. A més, els animals transduïts amb AAVrh10IGF-I presentaven un valor d'expressió de gens mielinitzants molt superiors als aconseguits amb AAV1IGF-I, en alguns casos gairebé tres vegades superiors als obtinguts amb AAV1.

P0 és la proteïna més abundant de la mielina, l'augment progressiu de les concentracions de P0 a nervi perifèric, després de la lesió, s'equipara amb la correcta progressió de la regeneració. Es va analitzar P0 per western-blot i es van obtenir nivells de la proteïna P0 més elevats en els animals tractats amb IGF-I, malgrat que no es van observar diferències estadísticament significatives respecte als nivells de proteïna P0 dels animals control. També vam detectar més proteïna P0 en el nervi ciàtic lesionat transduït amb AAVrh10IGF-I que no el transduït amb AAV1IGF-I. El fet que AAVrh10 tingui la capacitat de transduir neurones motores podria influenciar en els nivells d'expressió de P0, en els animals tractats amb AAVrh10IGF-I. Les neurones motores presenten beines de mielina grans, l'activació de la regeneració de fibres nervioses motores lesionades suposaria un augment dels nivells de proteïnes mielinitzants a nervi lesionat. Per tant, possiblement la transducció de neurones motores fa que s'observi un augment de P0 respecte els ratolins transduïts amb AAV1IGF-I.

En condicions d'hiperglucèmia s'altera la funció, metabolisme i morfologia de les SC, llavors a les SC es produeixen un seguit de senyals moleculars provocats per l'augment del flux de la via del poliol i l'estrès oxidatiu que fan que les SC no sintetitzin factors de creixement essencials per la regeneració axonal i la correcta mielinització d'aquests. La sobreexpressió d'IGF-I a neurones a través d'AAVrh10 estimularia la remielinització del nervi, activant l'expressió de gens mielinitzants en SC en proliferació en el model de lesió i diabetis.

Tant els estudis de transducció com els de capacitat de regeneració amb IGF-I han estat realitzats únicament a DRG i ME de la regió lumbar, que és la zona més pròxima al lloc d'injecció. Tot i que en neuropatia diabètica principalment es veuen afectats els nervis perifèrics de les extremitats inferiors (peus i cames), i vistos els resultats de tropisme, podem pensar que també hem transduït neurones de la regió toràcica i cervical. Tanmateix, IGF-I se secreta i la transducció de neurones perifèriques augmenta la concentració de IGF-I a LCR, com hem quantificat per ELISA. Probablement la presència d'IGF-I a concentracions elevades en el LCR actua en les diferents regions de SNP activant la supervivència i regeneració cel·lular.

Les proves neurofisiològiques són bàsiques pel diagnòstic i l'avaluació de les neuropaties perifèriques. Es poden trobar alteracions en la velocitat de conducció nerviosa en la majoria de pacients diabètics, fins i tot en absència de símptomes neuropàtics en exploracions físiques (Dyck *et al.*, 1993). En la majoria de pacients de diabetis tipus I mostren un empitjorament a nivell neurofisiològic amb el temps, sobretot canvis a nivell de velocitat de conducció nerviosa (NCV) i canvis en CMAP i CNAP (potencial d'acció compost a múscul i a nervi). La neuropatia diabètica en models animals també es caracteritza per l'alteració de la funció nerviosa perifèrica, observant tant en rates com en ratolins diabètics una disminució de la velocitat de conducció nerviosa, tot i que la magnitud varia depenent de la soca dels animals, de la durada de la diabetis, la dieta i la metodologia utilitzada (Kennedy and Zochodne, 2000).

Per avaluar la neurofisiologia del SNP en un model de neuropatia diabètica, es van realitzar tests electrofisiològics a ratolins control i tractats. Els estudis es van dur a terme a 3 i 4 setmanes després de l'administració intratecal del vector (7 i 8 setmanes de diabetis respectivament).

Quan es van analitzar les potes intactes es va observar que els animals transduïts amb AAV1IGF-I mostraven canvis significatius comparat amb els control, augmentant entre un 10-15% la velocitat de conducció nerviosa sensorial distal (SNCVd m/s), tant a setmana 3 com a setmana 4 després de l'administració del vector (* $p < 0,05$; $29,1 \pm 0,7$ controls i $32,0 \pm 0,6$ tractats a setmana 3 p.i.; $24,2 \pm 0,8$ control i $28,7 \pm 0,6$ tractats a setmana 4 p.i). En canvi, en els animals transduïts amb AAVrh10 IGF-I s'observaven canvis significatius respecte els controls a setmana 4 post injecció. Aquests presentaven amplituds CNAP (potencial d'acció compost a nervi) significativament més elevades (* $p < 0,05$) ($19,0 \pm 3,1$ en controls i $31,2 \pm 2,6$ en tractats), prop d'un 40% més altes que els controls. Tot i que no s'observen canvis significatius a nivell de conducció motora (MNCV) es van observar un augment del 15% en la velocitat de conducció superiors en animals tractats ($36,7 \pm 3,2$ controls; $42,3 \pm 2,6$ tractats).

Comparant els diferents paràmetres analitzats per electrofisiologia tant per AAV1 com AAVrh10, observem que AAV1 principalment influeix a nivell sensorial i rh10 a nivell motor. És important ressaltar que quan es compara els valors obtinguts per cada vector respecte animals control (Annex II), observem que pels animals tractats amb AAVrh10IGF-I s'obtenen resultats pròxims als obtinguts amb animals ICR control no diabètics en els paràmetres MNCV, SNCVp i CNAP.

També es va avaluar la capacitat de regeneració nerviosa mitjançant tests electrofisiològics a les potes lesionades de ratolins tractats i ratolins control. No es van observar diferències entre el ratolins injectats amb AAV1IGF-I i els control, al llarg de tot l'estudi. En canvi, sí que es van observar canvis a nivell de velocitat de conducció nerviosa (NCV) a les potes lesionades de ratolins tractats amb AAVrh10IGF-I, que mostraven diferències significatives a setmana 3 i 4 p.i. quant a velocitat de conducció nerviosa motora (MNCV) (* $p < 0,05$) ($10,4 \pm 2,2$ controls; $16,1 \pm 1,3$ tractats; setmana 3 p.i.) ($13,7 \pm 0,7$ controls; $18,8 \pm 1,2$ tractats; setmana 4 p.i.), amb uns nivells entre un 30 i un 40% més elevats que els control. També es van observar diferències significatives, , en els animals transduïts per AAVrh10IGF-I, superiors en un 40%, a nivell de conducció nerviosa sensorial distal (SNCVd) a setmana 4 p.i. ($6,0 \pm 0,7$ control; $10,0 \pm 1,9$ tractats).

Comparant la capacitat de regeneració nerviosa d'ambdós vectors podem dir que AAVrh10 és més eficient que AAV1. A més si comparem els valors obtinguts amb AAVrh10 IGF-I amb els valors obtinguts en ratolins ICR control amb crush, podem dir que AAVrh10IGF-I en condicions d'hiperglucèmia, és capaç de restablir les velocitats de conducció nerviosa motora i sensorial fins a nivells pròxims als obtinguts amb ICR controls no diabètics amb *crush* (Annex II) (Homs J *et al.*).

En estudis morfològics de nervis tibials intactes, els resultats obtinguts dels diferents paràmetres analitzats no varien entre els animals tractats i els control. No s'observen diferències en el nombre de fibres mielinitzades ni en el gruix de la mielina, que són paràmetres que es veuen alterats en diabetis. Per tant ni AAV1 ni AAVrh10 IGF-I, promouen canvis a nivell morfològic a les potes intactes. Respecte a les potes lesionades no s'han realitzat estudis morfomètrics ja que el procés de regeneració no està prou avançat per veure canvis significatius entre els animals tractats i els controls. Seria interessant fer un seguiment a més llarg plaç.

L'efecte d'IGF-I en neuropatia diabètica, ja s'havia demostrat en animals transgènics i també mitjançant proteïnes recombinants o vectors virals administrats via sistèmica. En estudis realitzats per Chu *et al.* AAV8-IGF-I és administrat al torrent circulatori, en un model murí d'hiperalgèsia causada per neuropatia diabètica, amb la finalitat de transduir el múscul i tenir un subministre constant d'IGF-I. Van observar que AAV-IGF-I era beneficiós tant en etapes inicials de neuropatia (hiperalgèsia), com etapes més tardanes (hipoalgèsia). IGF-I secretat pel múscul arriba a sistema nerviós perifèric i central, i depenent de la dosi de virus administrada

s'observa recuperació a nivell sensorial o motor. A dosis baixes, de $3 \cdot 10^9$ vg per ratolí, observen recuperació a nivell sensorial, però per observar canvis a nivell motor són necessàries dosis de fins a $3 \cdot 10^{11}$ vg, per tant l'eficiència d'AAV8-IGF-I via sistèmica és dosi dependent. Només a dosis molt altes observen un augment en el gruix de la mielina de fibres degenerades però també s'observava hiperplàsia muscular, efecte secundari que podria tenir conseqüències en els pacients diabètics. Com era d'esperar, els nivells normals d'IGF-I circulant no reverteixen les condicions hiperglucèmia (Chu *et al.*, 2008).

En el nostre model, l'administració d'AAV-IGF-I a LCR fa que el vector es centri en regions del sistema nerviós perifèric, a més a més, amb concentracions més baixes del vector ($9 \cdot 10^9$ vg) aconseguim transduir neurones a les diferents alçades de la ME i tenir efectes beneficiosos tant a nivell molecular com fisiològic.

VI. CONCLUSIONS

- 1- D'entre els vectors adeno-associats testats, AAV1 i AAVrh10 són els més eficients, capaços de transduir neurones sensorials en cultius organotípics de ganglis de l'arrel dorsal. Ambdós vectors transdueixen un 40% de neurones grans i un 60% de neurones petites.
- 2- En cultius organotípics de ganglis de l'arrel dorsal, AAV1 transdueix preferentment neurones petites positives per IB4 (60%) i AAVrh10 té una major afinitat per neurones petites positives per CGRP (70%).
- 3- La ruta d'injecció més eficient per infectar un nombre més elevat de neurones de sistema nerviós perifèric és mitjançant administració intratecal. Amb els vectors adeno-associats no s'aconsegueixen nivells comparables de transducció ni per via intraciàtic, ni intramuscular, ni intracoixinets.
- 4- La injecció directa intraciàtic de $9 \cdot 10^9$ vg transdueix tant neurones sensorials com cèl·lules de Schwann amb AAV1 i només neurones sensorials amb AAVrh10.
- 5- AAV1 administrat a líquid cefaloraquidi infecta al voltant del 15% de les neurones sensorials situades a la regió lumbar.
- 6- AAVrh10 quan s'administra per via intratecal transdueix al voltant del 50 % de les neurones sensorials tant a ganglis lumbar com toràcics i cervicals. D'entre les neurones sensorials, AAVrh10 infecta preferentment neurones peptidèrgiques (CGRP positives), seguit de les no peptidèrgiques (IB4 positives) i neurones sensorials grans.
- 7- La transducció eficient de motoneurones només s'aconsegueix amb AAVrh10, i està al voltant del 30%, al llarg de tota la medul·la espinal.
- 8- S'ha demostrat l'estabilitat de l'expressió del transgen en neurones sensorials i motores amb ambdós vectors fins a setmana 10 després de l'administració, amb una lleugera disminució a l'últim punt assajat per AAVrh10 a DRG.
- 9- L'administració intratecal d'AAV1 genera una resposta humoral en els ratolins molt superior a la que es genera amb AAVrh10, tal i com es demostra amb els títols d'anticossos neutralitzants presents a setmana 3 després de l'administració d'ambdós vectors.

10- S'ha detectat DNA del vector AAVrh10 a líquid cefaloraquidi a 1, 3 i 6 setmanes després de l'administració amb nivells del mateix ordre, indicant que la majoria del virus recombinant entra dins les cèl·lules infectades o és eliminat pel sistema immunitari del ratolí durant els primers dies després de la inoculació del vector.

11- Hem demostrat que mitjançant administració d'AAV1 o AAVrh10 codificant per IGF-I aconseguim augmentar la concentració de la proteïna recombinant a líquid cefaloraquidi d'animals diabètics. També demostrem un augment considerable dels nivells de mRNA d'IGF-I a DRG amb ambdós vectors i a medul·la espinal amb AAVrh10.

12- La sobreexpressió d'IGF-I activa la via Akt/PI3K i estimula la sobreexpressió de VEGF a DRG dels animals transduïts amb AAVrh10.

13- A les potes lesionades, IGF-I indueix la sobreexpressió de GAP43 indicant una estimulació de la regeneració del nervi perifèric, la qual està disminuïda en diabetis. Al mateix temps també s'observa un augment de l'expressió de les proteïnes de la mielina, suggerint que IGF-I estimula la diferenciació de les cèl·lules de Schwann en el nervi diabètic en regeneració.

14- Finalment, la sobreexpressió d'IGF-I a neurones de sistema nerviós perifèric estimula la velocitat de conducció nerviosa sensorial, quan s'ha administrat AAV1, i sensorial i motora, quan la transducció ha estat mitjançada per AAVrh10. Amb aquest vector, després de 4 setmanes d'expressió d'IGF-I, s'aconsegueixen resultats electrofisiològics semblants als dels ratolins no diabètics.

VII. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Vectors virals

En aquest treball s'han utilitzat diferents pseudotips de virus adeno-associats. Els vectors virals utilitzats en estudis de tropisme són: AAV2/1CMVnlsLacZ; AAV2/1, AAV2/2, AAV2/8 i AAV2/rh10 CAG-GFP-WPRE i scAAV2/rh10 CMV-GFP. En estudis de teràpia gènica els vectors utilitzats són AAV2/1 CAG-IGF-I-WPRE i scAAV2/rh10 CMV-IGF-I, amb els corresponents vectors controls AAV2/1 CAG-GFP-WPRE i scAAV2/rh10 CMV-GFP. Els diferents vectors virals han estat produïts per la Unitat de Producció de Vectors (UPV-CBATEG) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.2. Vectors plasmídics

Els plàsmids utilitzats en aquest treball són: *pAAV-CAG-PLK-WPRE*, pRSV-GFP, pGG2-IGF-I, PXX6 (Xiao *et al.*, 1998b), scCMV-GFP (cedit pel Dr. J.Samulski, University North Carolina, USA), p5E18RXC1 (Rep2Cap1), pSP72-RepCap (Rep2Cap2), p5E18-VD2/8 (Rep2Cap8) i pAAV2/rh10 (Rep2CapRh10) (cedits pel Dr. JM Wilson, University Pennsylvania, Philadelphia, USA).

1.3. Línies cel·lulars 293

Per la producció de virus adeno-associats s'utilitza una línia cel·lular immortalitzada anomenada **HEK-293** (*Human embryonic kidney cells*). Els AAV's es produeixen a partir d'un clon de la línia cel·lular HEK-293 anomenat **293-AAV** (Stratagene), que permet obtenir una eficiència més elevada de producció d'AAV. Mitjançant el clon **HEK-293QB** (Q-Biogene) es realitzen els assajos de titulació dels AAV's en presència d'anticossos neutralitzants en sèrum de ratolí.

1.4. Animals

Els animals utilitzats en aquest treball són ratolins de la soca ICR (Imprinting Control Region). Els ratolins han estat subministrats per l'estabulari SER-CBATEG, on tots els animals van seguir una dieta estàndard (2018S Teklad Global, Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, USA) i es van alimentar *ad libitum*. Durant el processos pre i postoperatoris els ratolins es van mantenir en condicions de temperatura i llum controlades, en cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor. Al llarg d'aquest treball s'han distribuït els ratolins ICR en dos grups, **ICR controls** i **ICR**

diabètics. Els ratolins **ICR controls** s'han utilitzant en estudis de tropisme pels diferents vectors virals injectats, i els **ICR diabètics** es van generar mitjançant cinc injeccions intraperitoneals consecutives de STZ (estreptozotocina) a una concentració de 45 mg/kg. Aquests ratolins passaven a formar part de l'estudi un mes després de la inducció de la diabetis, quan les concentracions de glucosa en sang eren superiors a 600 mg/dl (*high*), el nivell màxim de detecció del glucòmetre.

Pels diferents procediment quirúrgics descrits en aquest treball, els ratolins van ser anestesiats amb Ketamina/xilacina (100/10 mg/kg i.p.), exceptuant en estudis d'electrofisiologia on els ratolins van ser anestesiats amb pentobarbital (50 mg/kg i.p.). Per l'eutanàsia els animals es van anestesiar en funció de la finalitat a l'hora d'obtenir les mostres. Per l'obtenció de mostres de teixit fixat els animals s'anestesiaven amb Ketamina/xilacina (100/10 mg/kg i.p.) i seguidament se'ls practicava perfusió intracardíaca. Per mostres de teixit fresc els animals s'anestesiaven mitjançant anestèsic inhalador (Isoflurane, IsoFlo, Abbot Animal Health, Illinois, USA) i seguidament se'ls eutanasiava mitjançant decapitació. Tots els procediments experimentals van ser aprovats pel Comitè d'Ètica i Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona, UAB.

2. MANIPULACIÓ DE BACTÈRIES I TÈCNiques RELACIONADES

2.1. Tècniques de manipulació de bactèries

2.1.1. Preparació de bactèries competents/quimiocompetents

El mètode utilitzat per l'obtenció de bactèries quimiocompetents es basa en el mètode de sals de rubidi detallat en el protocol número 2 del catàleg de QIAGEN the Qiaexpressionist (www1.qiagen.com/HB/QIAexpressionist).

2.1.2. Transformació

Per transformar les cèl·lules quimiocompetents amb el plàsmid desitjat, es barregen 5µl de la reacció de lligació amb 100µl de la suspensió de cèl·lules competents (descongelades en gel durant 10 minuts). Es deixa la barreja durant 30 minuts en gel i posteriorment es realitza el *heat-shock* mantenint els vials 45'' a 42°C, seguit de 2 minuts en gel. S'afegeixen 300µl LB sense antibiòtic i s'incuben 60 minuts a 37°C en agitació permanent. Es centrifuguen a 900 rpm durant 10 minuts, s'aspira el sobrenedant deixant uns 100µl de medi per resuspendre les cèl·lules. Les cèl·lules resuspeses se sembren amb una nansa de Digrafsky sobre una placa preescalfada a 37°C de LB-agar més l'antibiòtic de selecció i es deixen O/N a 37°C.

- Tots els plàsmids utilitzats en aquest treball presenten resistència a l'antibiòtic ampicilina.

Reactius i solucions

TFB1: 100mM Clorur de Rubidi, RbCl, 50mM clorur de magnesi MnCl₂, 30mM acetat potàssic, 10mM clorur càlcic, 15% glicerol, pH=5,8 (HCl);

TFB2: 10mM MOPS, 10mM Clorur de Rubidi (RbCl), 75mM clorur càlcic, 15% glicerol, pH=6,8 (HCl).

LB-agar: Luria Broth (Miller's LB Broth), agar amb ampicilina a 100µg/ml.

2.2 Tècniques d'obtenció i manipulació d'àcids nucleics

2.2.1. Minipreparacions de DNA plasmídic.

Aquest procediment ha estat utilitzat en passos intermedis dels diferents clonatges realitzats en aquest treball i té com a objectiu obtenir petites quantitats (10-20µg) de DNA plasmídic. Partim d'una placa d'un cultiu bacterià pur, s'inocula una colònia aïllada i es fa créixer O/N en 3ml de

LB més antibiòtic. Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic es realitzen minipreparacions de DNA per lisi alcalina del cultiu i posterior precipitació en isopropanol. La puresa del DNA obtinguda és baixa, però suficient per poder realitzar digestions amb enzims de restricció o amplificar per PCR.

Es centrifuguen 1,5ml de cultiu bacterià 1 minut a 13200rpm, es descarta el sobrenedant i es resuspenen en 200µl de solució de resuspensió (P1), s'afegeixen 400 µl de tampó alcalí (P2), i es barreja suaument la solució i s'incuba 5 minuts a temperatura ambient. S'afegeixen 400µl de la solució de precipitat proteic (P3) i s'inverteix fins a homogeneïtzar el precipitat, s'incuba en gel durant 10 minuts i es centrifuga 10 minuts a 13200rpm. Es recupera el sobrenedant en un tub nou, s'afegeixen 0,6 volums d'isopropanol s'incuba 10 minuts a temperatura ambient. Centrifugar durant 10 minuts a 12000rpm per precipitar el DNA. Rentar amb 400µl d'etanol 70 % (v/v) i es centrifuga 8 minuts a 13200rpm. Resuspendre amb 30µl d'aigua MiliQ amb RNAsa.

Reactius i solucions

P1 Solució de resuspensió (4°C): 50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA; 100ug/ml RNAsaA.

P2 Solució de lisi: 200mM NaOH, 1% SDS (p/v).

P3 Solució de precipitació proteica (4°C): 3,0M acetat potàssic pH=5,5.

100µg/ml RNAasaA (Sigma-Aldrich).

2.2.2. Maxipreparacions de DNA plasmídic.

Aquest procediment s'ha utilitzat per obtenir grans quantitats de DNA plasmídic (250-1000 µg) de gran puresa, imprescindible per la transfecció de cèl·lules de mamífer. Les maxipreparacions es realitzen a partir de 250ml de cultiu bacterià saturat i s'utilitza el sistema comercial de E.Z.N.ATM Fastfilter (Omega Bio-Tek) seguint el protocol recomanat pel fabricant.

2.2.3. Megapreparació de DNA plasmídic

Per l'obtenció de DNA plasmídic en grans quantitats (1g-2g) s'ha utilitzat el kit comercial Plasmid Mega Kit (Qiagen), seguint el protocol recomanat pel fabricant. Es parteix d'un cultiu bacterià saturat de 2l.

2.2.4. Quantificació del DNA

Per quantificar el DNA obtingut mitjançant els diferents procediments (minipreparacions, maxipreparacions, megapreparacions) es realitza una lectura de la preparació de DNA mitjançant el NanoDrop, a una longitud d'ona λ 260nm (OD 260/280), (NanoDrop Technologies, Inc.

Wilmington, DE, USA), que és un espectrofotòmetre capaç de llegir volums de mostra petits (1-2µl). El software ND-1000 ens permet determinar la concentració de DNA en µg/µl i la puresa d'aquest.

2.3. Electforesi de DNA en gels d'agarosa

Aquesta tècnica s'utilitza per separar fragments de DNA de diferent mida. Les mostres de DNA amb càrrega negativa neta se sotmeten a un camp elèctric i migren a través d'una matriu (gel) cap a l'ànode, proporcionalment a la mida del DNA. El percentatge d'agarosa (Seaken LE Agarose #50005 Iberlabo) del gel varia entre 1% i 2% segons els fragments que es volen aïllar o analitzar. Les mostres a analitzar es carreguen al gel juntament amb el tampó de càrrega, que conté blau de bromofenol i xilencianol (que migren cap a l'ànode com a fragments de 500bp i 4 kb respectivament per monitoritzar correctament l'electforesi) i glicerol. S'estima el fragment de DNA amb un marcador de pesos moleculars de 1kb de DNA (1µg/ml) *GeneRuler 1Kb DNA Leader* (Fermentas). Per preparar els gels d'agarosa i córrer les mostres s'utilitza TAE 1x. Per visualitzar els fragments de DNA digerits, es tenyeixen els gels d'agarosa en una solució de Bromur d'etidi 6µg/ml durant 20-30 minuts. Aquest compost s'intercala entre les cadenes de DNA i el complex presenta un color taronja quan se sotmet a un transil·luminador d'UV per visualitzar els fragments de DNA.

Reactius i solucions

Tampó d'electforesi TAE 1x: 40mM Tris-Acetate pH 8,0; 0,1mM EDTA pH 8,0

Tampó de càrrega: 50% glicerol (v/v); 100mM EDTA pH 8,0; 1% SDS p/v; 0,1% Blau de Bromofenol p/v, 0,1% Xilencianol p/v.

Material

Fonts d'electforesi Power Pac Basic (BIORAD).

Portagels i cubetes MAX FILL (BIORAD).

Fotodocumentador amb llum UV (Sygene Imaging de Sygene).

Programa de visualització i captació d'imatges Genesnap (Sygene).

2.4 Construcció de plàsmids

Les diferents construccions plasmídiques utilitzades en aquest treball s'obtenen mitjançant tècniques bàsiques de clonatge de fragments de DNA. Per obtenir els fragments primer es digereixen els DNAs tant de l'insert com el plàsmid d'expressió amb enzims de restricció i

seguidament es purifica el fragment resultant. Posteriorment es lliga el fragment obtingut de la digestió (o insert) en el plàsmid corresponent.

2.4.1. Enzims de restricció i desfosforilació

Les endonucleases de restricció són enzims de restricció purificats a partir de diferents soques bacterianes o fongs, les quals actuen reconeixent específicament seqüències curtes de nucleòtids i trencant enllaços fosfodièsters de l'hèlix de DNA en un lloc concret.

S'han utilitzat entre 4 i 10 U de digestió per 1µg de DNA plasmídic seguint les condicions de temperatura i solució establertes pel fabricant. El temps de digestió varia entre 2 a 18 hores en funció de les unitats enzimàtiques administrades, les reaccions s'incuben a la temperatura òptima de l'enzim, que generalment sol ser a 37°C. Els enzims de restricció utilitzats en aquest treball provenen de la marca Fermentas i New England Biolabs.

2.4.2. Lligació de fragments de DNA

La tecnologia del DNA recombinant es basa en unir dos segments de DNA per generar una única molècula de DNA capaç de replicar-se de forma autònoma dins un bacteri. Quan es digereix amb un únic enzim de restricció ó amb dos enzims que generen extrems roms o compatibles, és necessari realitzar una desfosforilació dels extrems per evitar la relligació del vector. En aquest treball s'ha utilitzat l'enzim TSAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Promega) per desfosforilar els extrems i evitar la relligació. El procediment seguit consisteix en afegir 1ul de TSAP a la solució de DNA que es vol lligar, s'incuba a 37°C 1h i seguidament s'inactiva a 74°C durant 15'. Per la catàlisi de la reacció de lligació utilitzem la T4DNA lligasa, (New England Biolabs), purificada a partir del fag T4. La DNA lligasa catalitza de forma ATP-dependent la formació de ponts fosfodièster entre un grup 5' fosfat i un grup 3' hidroxil del DNA de doble cadena. Aquesta activitat enzimàtica permet unir fragments de DNA digerits prèviament amb enzims de restricció que tenien extrems roms o compatibles. Les reaccions de lligació es realitzen a 16°C O/N, es transformen els productes de les lligacions en *Ecoli* (apartat 2.1.2.). A partir dels bacteris del precultiu s'extreu el DNA plasmídic y es confirma la correcte orientació de l'insert al vector mitjançant la digestió amb enzims de restricció.

La purificació de fragments de DNA resultants de la digestió en gels d'agarosa, es realitza mitjançant el kit *GeneClean TurboKit* (Q-BIOgene), seguint el protocol facilitat per el fabricant. El mètode es basa en la capacitat del DNA d'unir-se a una matriu de sílica.

3. CULTIUS CEL·LULARS I TÈCNIQUES RELACIONADES

3.1. Tècniques generals de cultiu cel·lular

La manipulació de cultius cel·lulars i vectors virals adeno-associats es realitza en condicions de bioseguretat de nivell 2 seguint el Reglament de Seguretat de la Unitat de Producció de Vectors (UPV) del CBATEG. Tots els residus generats són eliminats segons els procediments corresponents al nivell de bioseguretat 2.

3.1.1. Manteniment i diferenciació de cultius cel·lulars en monocapa

El manteniment dels dos tipus cel·lulars utilitzats en aquest treball, HEK293-QB i HEK293-AAV es realitza en plaques de 15cm (Nunc). El medi de creixement consisteix en DMEM suplementat amb 10% FBS (Sèrum fetal boví) i 1 % penicil·lina/estreptomicina (P/S). S'aspira el medi de la placa i es renta la monocapa de cèl·lules amb D-PBS 1X, aquest s'elimina i s'afegeixen entre 3 i 5ml de tripsina, es deixa actuar uns 3 minuts a 37°C per saltar la monocapa de cèl·lules. S'afegeixen 5 ml de medi de creixement per inhibir l'acció de la tripsina, s'homogeneïtza la resuspensió cel·lular i es centrifuga 5 minuts a 1000rpm. Decantar el sobrenedant i resuspendre el pellet en 5 ml de medi de creixement. Per cada placa de 15cm se sembra una dilució de ¼ dels 5 ml si les cèl·lules són per transfectar i una dilució de 1/100 si són pel manteniment setmanal. El volum final de medi per placa és de 18ml i s'incuben a 37°C i 5% de CO₂.

Reactius i solucions

Medi de creixement: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)(PAA), FBS (sèrum fetal boví), Penicil·lina/estreptomicina (PAA).

Tampó D-PBS (1X) (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline): 137mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,7mM KH₂PO₄ pH 7,4.

Tripsina-EDTA (1x) (PAA).

3.1.2. Criopreservació: congelació i descongelació de vials

Es tripsinitzen les cèl·lules i es centrifuga la resuspensió seguint els passos descrits en l'apartat anterior (3.1.1). Es resuspenen les cèl·lules en 1ml de medi de congelació i es traspasa la suspensió a un criotub de congelació (Nunc), ràpidament es dipositen en un dipòsit de congelació gradual, i es deixa a -80°C, passades 4 hores mínim els tubs es mantenen a -80°C fins a la seva utilització.

Per descongelar un vial de cèl·lules, es manté al bany a 37°C i quan s'inicia la descongelació del vial ràpidament es traspasa el contingut a un tub cònic de centrifuga amb 10 ml de medi de cultiu. Es precipiten les cèl·lules per centrifugació 5 minuts a 1000rpm. Es resuspenen les cèl·lules amb 5 ml medi de creixement i es realitza el seu manteniment seguint el protocol descrit a l'apartat 3.1.1.

Reactius i solucions

Medi de congelació per cèl·lules 293: FBS complementat amb 10% de DMSO (Sigma-Aldrich).

3.2. Producció de vectors Adeno-associats amb iodixanol

3.2.1. Transfecció

El mètode utilitzat per la producció d'AAVs es basa en el protocol d'una triple transfecció que permet la obtenció de preparacions lliures d'adenovirus contaminants. Cada plàsmid té una funció específica en el procés de producció de vectors virals. El psP72-RepCap (helper AAV) codifica per les proteïnes necessàries per la replicació viral i aporta les proteïnes de la càpside, pXX6 aporta les funcions adenovirals necessàries per la replicació de l'AAV i per últim un plàsmid que conté el casset d'expressió flanquejat pels ITRs virals que contenen la senyal d'empaquetament del virus.

Partim de 20 plaques de 15 cm de diàmetre en cultius en monocapa de 293-AAV al 60% de confluència. Es realitza la triple transfecció amb PEI 1X utilitzant 500µg de pXX6, 250µg de psP72-RepCap i 250µg del plàsmid que conté el casset d'expressió flanquejat pels ITRs. Per cada 5 plaques es barreja :

-125 µg pXX6 + 62,5 µg plàsmid codificant per RepCap + 62,5 µg plàsmid que codifica pel genoma de l'AAV en 5 ml NaCl 150 mM

- 562,5 µl 10 mM PEI en 5 ml NaCl 150 mM

S'incuba el complex DNA:PEI 20 min a temperatura ambient. S'aspira el medi de les plaques i s'afegeix 12ml de medi de transfecció. A cada placa s'hi posen 2ml del complex DNA:PEI i s'incuba durant 6 hores. Transcorregut el temps d'incubació s'eliminen 6 ml de medi de transfecció i s'afegeixen 6ml de medi de creixement, després de 24 hores post-transfecció s'afegeixen 6ml més de medi de creixement.

Reactius i solucions

NaCl 150mM (B.Braun), PEI 10mM (polietelenimina) (Sigma-Aldrich), medi de transfecció (DMEM + 1% FBS, *Fetal Bovine Serum*, + 1% Pen/Strep), medi de creixement (DMEM +10%FBS + 1% Pen/Strep)(PAA).

3.2.2. Recol·lecció

Transcorregudes 48 hores des de la transfecció es recullen les cèl·lules. Les cèl·lules se salten amb un *scraper* (Nunc) i es traspassen a tubs centrífuga de 50ml. Es centrifuguen els tubs 10 min a 200g a temperatura ambient. Es resuspenen els pellets en 30 ml totals de tampó de resuspensió d'AAV i s'ajunten tots en un sol tub. Es congela a -80°C. Les cèl·lules es lisen en tres cicles de congelació-descongelació (descongelació 30 minuts a 37°C-congelació 1h a -80°C), es centrifuga 10 minuts a 2000g i es recull el sobrenedant 30ml (lisat cru). Un cop finalitzat el procés de congelació-descongelació, es realitza una purificació per gradient de iodixanol.

3.2.3. Purificació per gradient de iodixanol

En aquest punt es realitza un tractament amb benzonasa (50U/ml de benzonasa; 1h a 37°C) del lisat cru, per eliminar les restes de DNA cel·lular i DNA plasmídic que no s'ha encapsidat. Es centrifuga 20 minuts a 3000g i es recupera el sobrenedant lisat post-benzonasa (volum 30ml). Prèvi al pas de la purificació es fa una precipitació amb polietilenglicol (PEG) per clarificar el lisat víric que permet precipitar els virus i mantenir solubles gran part de les proteïnes cel·lulars que contaminen la preparació.

Els virus es purifiquen per densitat mitjançant un gradient discontinu de iodixanol (Optiprep). (60% amb 7 µl de Phenol Red, 40% en PBSMK, 25% en PBSMK amb 20 µl de Phenol Red i 15% en PBSMK-1M NaCl) i s'afegeixen al tub seguint l'ordre següent : 1) 7,5ml de Iodixanol al 15%, 2) 5ml de Iodixanol al 25% (fase vermella), 3) 3,5ml de Iodixanol al 40% i 4) 4ml de Iodixanol al 60% (fase groga). Seguidament afegim el llistat cru a la part superior del tub. Es centrifuga 90 minuts a 18°C a 69.000rpm en el rotor 70Ti. Un cop finalitzada la centrifugació amb el Fraction Recovery System (Beckman) es recullen fins a 10 fraccions de 500µL cadascuna.

Reactius i solucions

Tampó de Resuspensió: Tris 50mM, NaCl 20mM, MgCl₂ · 6H₂O 2mM, pH 8,5

Benzonasa (Novagen), Phenol Red (Sigma-Aldrich), 40% PEG-8000 (Biochemika)

PBSMK: NaCl 1M, KCl 5mM, Na₂HP·7H₂O 5mM, KH₂PO₄ 0,85mM, MgCl₂ 1mM, pH 7,4

Materials

Tubs Ultracentrífuga OptiSeal, xeringues de 5, 10 x 20 ml, agulles Sterican 18G, agulles de infiltració ubre (SR900, BBraun Surgical) i adaptador de conus veterinari a Luer-lock, segelladora de tubs (Beckman).

3.3. Titulació de genomes virals per picogreen

Adaptat de “Picogreen Assay on AAV Genome Copy Titter” d’Applied Viromics.

El mètode utilitzat per la determinació dels genomes virals dels virus adeno-associats, es basa en lissar les càpsides a 70°C i quantificar el DNA encapsidat mitjançant una sonda fluorescent. El kit utilitzat en aquest procediment és *Quant-it™ PicoGreen® ds DNA Assay Kit* (Invitrogen) seguint el protocol facilitat pel fabricant.

La lectura de les mostres es realitza en plaques opaques de poliestirè de 96 pous (Corning), mitjançant un fluorímetre (Victor-3). Per calcular el nombre de genomes virals per mil·lilitre de l’estoc viral (vg/ml) partim d’una recta patró que conté els punts: 40, 13.33, 4.44, 1.48, 0.49, 0.16, 0.12 i 0 ng. Aquesta recta patró es prepara mitjançant el DNA λ adjunt al kit. Interpolant a la recta patró obtenim els ng de DNA viral de la mostra i seguint la fórmula següent podem determinar els genomes virals (vg/ml).

$$A \times 1,82 \cdot 10^{12}$$

B

A són els ng/ml de DNA:

$$\text{ng/ml} = \text{ng en un pou (interpolat a la recta)} \times 1000 / C$$

B és la longitud del genoma de l’ AAV (distància en bases entre les ITR)

i C és el número de µl llegits.

Reactius i materials

Tampó lisis Picogreen: Tris-HCl 20mM, SDS 10%, NaCl 200mM

Tampó TE: Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH: 8,0.

4. MANIPULACIÓ DELS ANIMALS I TÈCNiques RELACIONADES

4.1. Cultius organotípics

Per obtenir mostres dels diferents teixits ex vivo s'han utilitzat ratolins ICRs mascles adults de 8-10 setmanes d'edat. Els animals se sotmeten uns 10-15 segons amb isofluorane (Isofluorane, IsoFlo, Abbot Animal Health, Illinois, USA), suficients per anestesiari-los i seguidament es decapiten i s'extreu el màxim de sang possible. S'extreu el teixit mostra en fresc i es disposa en una placa que conté medi HBBS Hanks complimentat amb calci i magnesi. Les mostres de teixit es mantenen en flotació en medi específic per cultius organotípics 24h i seguidament són infectades amb el vector viral corresponent (AAV2/1 CAG-GFP i AAV2/rh10 CAG-GFP). Transcorreguts de 7 a 8 dies post-infecció, les mostres són fixades en paraformaldehid al 4% en tampó fosfat sòdic O/N a 4°C en agitació. Seguidament es realitzen 5 rentats de 15 minuts en tampó fosfat sòdic per eliminar l'excés de solució de fixat i les mostres són incloses en agarosa 6%.

La viabilitat cel·lular dels DRG en cultiu es va avaluar mitjançant iodur de propidi (molècula fluorescent que s'intercala en el DNA) a dia 1, 3, 8 i 12, observant una viabilitat dels DRG en cultiu fins a 12 dies.

Reactius i solucions

Medi cultiu organotípics: DMEM-F12, 25% glucosa, 10% sèrum de cavall inactivat per calor, 1% Penicil·lina/estrpetomicina,

Medi infecció (500ml): 250ml DMEM-F12, 200ml MEM, 1ml Vitamines, 1ml aminoàcids no essencials, 2,5ml gentamicina, 5ml Penicil·lina/Esptreptomicina (PAA).

Tampó fosfat sòdic: 19 ml Fosfat monosòdic 0,1M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 81 ml Fosfat bisòdic 0,1M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), pH 7,4.

Iodur de propidi (Sigma-Aldrich)

4.2. Injecció Intracoixinets

L'animal anestesiàt es disposa amb la zona ventral tocant el suport on es realitza la cirurgia i les extremitats posteriors es col·loquen de manera que se'ns permet visualitzar la regió plantar. En aquesta regió és on es troben localitzats els coixinets. Els ratolins tenen sis coixinets a cada regió plantar de cadascuna de les extremitats posteriors segons la figura 49 descrita a continuació:

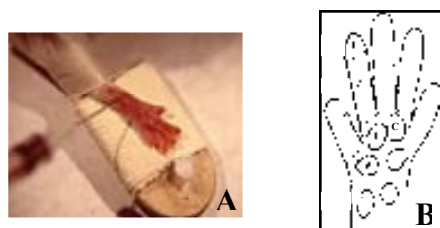


Figura 49: A) Imatge de la regió plantar de les extremitats posteriors de ratolí, on es visualitzen els coixinets. B) Esquema de la distribució dels sis coixinets, on es marquen amb les lletres A, B i C, els coixinets injectats en aquest procediment.

En el procés d'injecció intracoixinets només s'injecten tres dels sis coixinets de cada regió plantar (A, B i C) mitjançant una xeringa Hamilton de 10 µl amb una agulla de 33G de punta bisellada. La xeringa està connectada a un suport i aquest a una microbomba d'infusió (Micro4, microsyringe Pump Controller, World Precision Instruments), que ens permet infondre el virus a un volum constant de 400nl/min. A cada coixinet s'injecta un 1µl de virus i es manté l'agulla durant un minut un cop finalitzada la infusió del vector viral, per evitar reflux.

4.3. Injecció Intramuscular

La injecció intramuscular es realitza a nivell del múscul *gluteus maximus*, el qual està inervat per terminacions nervioses que es ramifiquen del nervi ciàtic. Als animals anestesiats i amb la regió dorsal de les extremitats posteriors afaitades se'ls realitza una incisió a nivell de la dermis exposant el múscul a injectar. Es realitzen tres injeccions consecutives de 1µl cadascuna a una àrea de 3mm² del *gluteus maximus*. Aquest procediment es realitza mitjançant una xeringa Hamilton de 10 µl amb una agulla de 33G de punta bisellada i connectada a una microbomba d'infusió (Micro4, microsyringe Pump Controller) (World Precision Instruments), i s'injecta el virus a una velocitat constant de 400nl/min. Finalitzada la injecció es sutura la dermis amb grapes estèrils (Fine Science Tools, FST).

4.4. Injecció intraciàtic

Per aquest procediment s'afaita la zona dorsal de les extremitats posteriors i llavors es procedeix a la cirurgia. Es realitza una incisió a nivell de la dermis seguidament se separen els músculs *gluteus maximus* i *gluteus medius*, entre els quals visualitzem el nervi ciàtic. S'anestesia localment la zona a manipular amb bupivacaina 0,5% (B.Braun) i es procedeix a la injecció intraciàtic del vector viral. Per injectar el virus s'utilitza una xeringa Hamilton de 10 µl amb una

agulla de 33G de punta bisellada. La xeringa es connecta a una microbomba d'infusió (Micro4, microsyringe Pump Controller, World Precision Instruments), que ens permet infondre el virus a una velocitat constant de 400nl virus/min (Figura 50).

En el procés d'injecció es disposa la xeringa paral·lelament al nervi ciàtic, direccionant l'agulla segons el recorregut del nervi i amb el bisell de l'agulla cap amunt. El primer pas consisteix en travessar el teixit connectiu o epineuri que envolta el feixos que formen el nervi ciàtic i s'introdueix l'agulla uns mil·límetres dins l'epineuri. Seguidament s'inicia la infusió del virus (3µl per nervi ciàtic). Finalitzat el procés es manté l'agulla dins l'epineuri durant un minut, per evitar l'efecte reflux de la solució viral en el lloc d'injecció i perquè la retirada de l'agulla causi el menor dany possible al nervi. Es realitza una sutura a nivell de la dermis mitjançant grapes estèrils (Fine Science Tools, FST).



Figura 50: Visualització del procés d'injecció del nervi ciàtic a ratolí.

4.5. Injecció intratecal

La injecció intratecal ens permet introduir el vector viral d'interès a líquid cefaloraquídi (LCR), permetent una àmplia difusió del virus pel sistema nerviós.

Es realitza una incisió al llarg de la dermis des de la regió toràcica fins a la part final de la regió lumbar i se separa la musculatura que envolta les vèrtebres lumbar fins a l'observació d'aquestes. La injecció es realitza a la regió lumbar entre les vèrtebres L3-4 manualment, mitjançant una xeringa Hamilton de 10µl i una agulla de 33G amb bisell. S'anestesia localment la zona a manipular amb bupivacaina 0,5% (B.Braun). Per infondre el virus al LCR s'introdueix uns mil·límetres l'agulla a la regió intervertebral (on es cavalquen les vèrtebres), es realitza una petita pressió per poder perforar l'aracnoides i s'injecta el virus lentament. Un cop injectat s'espera un minut abans de treure l'agulla per evitar reflux de la solució viral. Se sutura la musculatura amb tres o quatre punts amb fil de sutura de 5/0 (BBraun) i la dermis mitjançant grapes estèrils (FST) (Figura 51).



Figura 51: Visualització de la regió on es realitza la injecció intratecal.

4.5.1. Extracció de líquid cefaloraquidi

Per realitzar l'extracció de líquid cefaloraquidi s'immobilitza l'animal a la base de l'aparell estereotàxic (David Kopf) (Figura 52A).

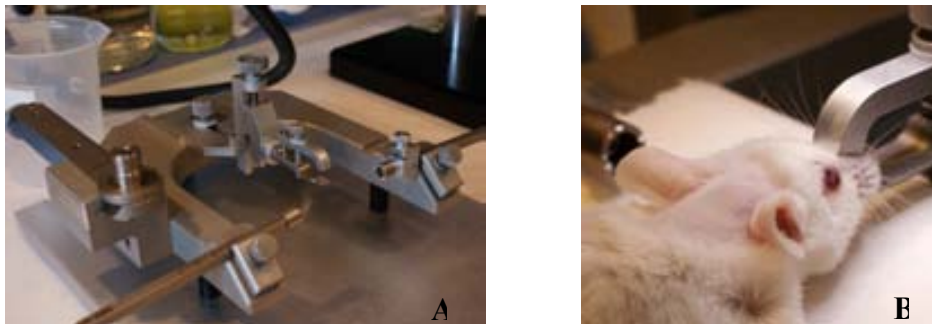


Figura 52: **A)** Imatge de l'aparell estereotàxic, més concretament de la part on s'immobilitza l'animal. **B)** Imatge on es mostra la correcta disposició del cap de l'animal, per poder procedir a la cirurgia.

A l'animal profundament anestesiats se li afaïta la regió cervical i part del crani. S'immobilitza l'animal a l'aparell estereotàxic (Figura 52B), i es realitza una incisió a nivell de la dermis a la regió occipital del crani fins a la regió cervical. Se separa la musculatura de la regió posterior del coll fins a observar l'aracnoides a nivell de la cisterna magna, a ambdós costats del crani. S'anestesia localment la zona amb bupivacaina 0,5% (B.Braun). Per extreure el LCR s'utilitza un microcapil·lar de vidre tallat amb la flama, unit al mateix temps a un tub aspirador de silicona (Sigma-Aldrich). Realitzant una lleugera pressió amb la punta del microcapil·lar de vidre es perfora l'aracnoides i s'accedeix a la cavitat de la cisterna magna. Inicialment per capil·laritat i seguidament amb l'ajut del tub aspirador s'extreu el LCR. Aquest té una aparença transparent i lleugerament densa. La perforació de l'aracnoides és un pas crític, perquè si es realitza massa pressió es pot lesionar l'artèria vertebral, llavors el LCR es dilueix amb la sang i no es considera apte per realitzar assajos posteriors. El volum de LCR obtingut

varia en funció de l'èxit del procés d'extracció, però generalment oscil·la entre 5 i 10 μ l per animal (Figura 53).

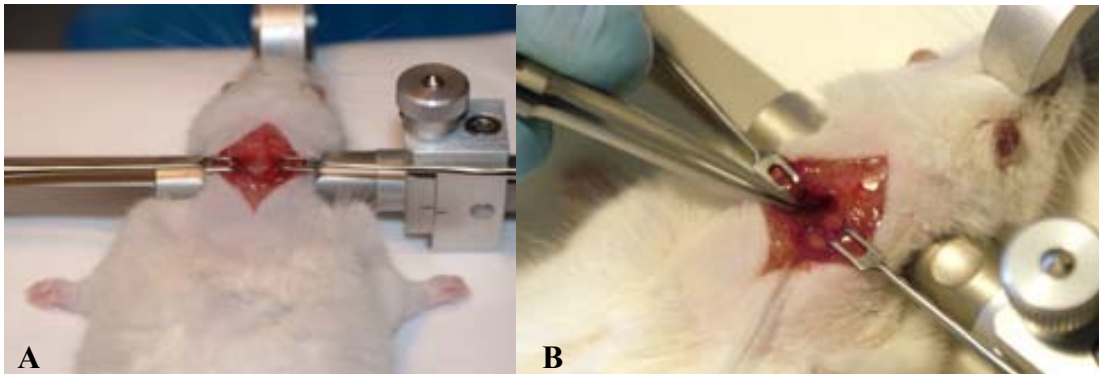


Figura 53: Imatge del primer pas per iniciar el procés de extracció del líquid cefaloraquidi, a nivell de la cisterna magna, es visualitza l'aracnoides (color blanc). Imatge on es mostra el moment de la punció amb el microcapil·lar de vidre, a la regió de la cisterna magna, per procedir a l'extracció del líquid cefaloraquidi.

4.6. Lesió quirúrgica a nervi ciàtic (*Crush*)

Seguint el procediment descrit a l'apartat 4.4., es visualitza el nervi ciàtic i s'anestesia localment la zona a manipular amb bupivacaina 0,5% (B.Braun). Mitjançant un *mosquit* (World Precision Instrument) es lesiona el nervi 3 vegades durant 30 segons a una pressió constant. La lesió es realitza a un punt determinat, mesurat des de la punta del tercer dit fins a 42 mm de distància d'aquest. Se sutura la dermis amb grapes estèrils (FST) (Figura 54).



Figura 54: Visualització de l'aixafament del nervi ciàtic (*crush*), amb un mosquit per realitzar la lesió quirúrgica a la regió desitjada.

Taula dels vectors virals utilitzats en aquest treball:**-Estudis de tropisme en ratolins ICR controls (Taula 8):**

Pseudotip	Promotor	Transgen	Altres	Mètode injecció*
AAV2/1ss	CMV	nlsLacZ		Ic / IT/Icx/IM
AAV2/1ss	CAG	GFP	WPRE	IT
AAV2/rh10ss	CAG	GFP	WPRE	IC / IT/ICx/IM
AAV2/rh10sc	CMV	GFP	intró	IT

*Ic: intraciàtic, IT: intratecal; ICx: intracoixinets; IM: intramuscular.

-Estudis de teràpia gènica en ratolins ICR control i ICR diabètics (Taula 9):

Pseudotip	Promotor	Transgen	Altres	Mètode injecció*
AAV2/1ss	CAG	GFP	WPRE	IT
AAV2/1ss	CAG	IGF-I	WPRE	IT
AAV2/rh10sc	CMV	GFP	intró	IT
AAV2/r10hsc	CMV	IGF-I	intró	IT

* IT: intratecal.

4.7. Electrofisiologies

Els estudis electrofisiològics han estat realitzats en col·laboració amb el Dr. Xavier Navarro, Grup de Neuroplasticitat i Regeneració, Dept. Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona.

Els estudis de conducció nerviosa es realitzen a nervi ciàtic de forma bilateral (Navarro et al 1994, Verdú et al 1999) en dos períodes de temps a 24 i 31 dies després de la lesió quirúrgica. Als animals anestesiats amb (pentobarbital 40 mg / kg ip), s'estimula el nervi per via percutània mitjançant un parell d'elèctrodes d'agulla petita. En primer lloc s'estimula les regions de l'escotadura ciàtica i el turmell. Se'ls aplica pulsos elèctrics rectangulars (Grass S88) de 0.01-0.05 ms de duració. Els pulsos aplicats són un 25% superiors a la tensió que dona una resposta màxima. Els potencials d'acció muscular compost (CMAP), provocat per la conducció ortodròmica (ona M) i per l'arc reflex monosinàptic (ona H), es registren en els músculs plantars i als músculs tibials anterior, amb elèctrodes microagulla. El mateix procediment s'ha utilitzat per enregistrar el potencial d'acció compost (CNAP) a nervi sensorial mitjançant elèctrodes col·locats al quart dit del peu, prop dels nervis digitals. Tots els potencials d'acció evocats es mostren en un oscil·loscopi (Tektronix 420) a valors adequats per mesurar l'amplitud de línia de

base a pic i la latència de l'inici de la CMAP i de la CNAP i del pic d'ona de H. La velocitat de conducció nerviosa (NCV) es calcula per a cada segment de prova: Velocitat de conducció nerviosa NCV motora de l'escotadura ciàtica, velocitat de conducció nerviosa sensorial pel segment proximal que va des de l'escotadura ciàtica fins al turmell (SNCVp) i pel segment distal que mesura la velocitat de conducció del turmell als dits (SNCVd). Durant les proves electrofisiològiques, els animals testats es van mantenir sobre en una placa calefactorsa controlada per una bomba d'aigua calenta circulant, i a una temperatura per sobre de 32°C.

4.8. Anàlisi morfomètric de nervis tibials

4.8.1. **Inclusió en resina spurr**

Treball realitzat pel Servei de Morfologia del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

Els nervis tibials es van fixar en gluteraldehid-paraformaldehid (2,5% : 2%) en tampó fosfat, O/N a 4°C. Es continua el procés amb una postfixació del nervi tibial amb tampó fosfat més Tetraòxid d'osmi (OsO₄) al 1% i Ferricianur potàssic al 0.8% (K₃Fe(CN)₆) durant 1 hora a 4°C. Es renten les mostres 4 x 10 minuts amb tampó fosfat sòdic a 4°C. Les mostres es deshidraten amb un gradient creixent d'acetona (30 % -100%) a 4°C i en agitació. Seguidament es realitza una inclusió en resina spurr dels nervis tibials a 4° en agitació.

<u>DESHIDRATACIÓ</u>		<u>INCLUSIÓ</u>	
%	TEMPS	RESINA : ACETONA	TEMPS
30	10 min.	1 : 3	5 h.
50	10 min.	2 : 2	O/N
70	1 x 10' + 1 min.	3 : 1	5 h.
80	2 x 10 min.	Pura	O/N
90	2 x 10 min.	Pura	5 h.
96	3 x 10 min.	Pura	48 h.
100	3 x 10 min.		

De les mostres fixades i incloses en resina spurr es van realitzar talls semifins de 0.5 micres mitjançant un ultramicrotom (Leica EM UC6). Els talls semifins es van tenyir amb una solució 1% blau de Toluidina per poder sotmetre els tibials a una anàlisi morfomètrica.

Reactius i solucions

Resina Spurr: Vinylcyclohexene dioxide (1,2-Epoxy-4-epoxyethylcyclohexane, 3-Epoxyethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane), (2-Nonen-1-yl)succinic anhydride, 2-Dimethylaminoethanol (N,N-

Dimethyl-2-hydroxyethylamine, N,N-Dimethylethanolamine), Dibutyl Phthalate, D.E.R.TM 736 (Sigma-Aldich).

Tampó fosfat sòdic: 19 ml Fosfat monosòdic 0,1M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 81 ml Fosfat bisòdic 0,1M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), pH 7,4.

4.8.2. Morfometries

Per realitzar l'anàlisi morfomètric a seccions de nervi tibial obtingudes seguint el protocol de l'apartat 5.8.1., i inicialment es capten imatges de les seccions de nervi amb una càmera digital Olympus CC-12 *Soft Imaging System* connectada un microscopi Nikon Eclipse E800. Primer es capta una imatge de la secció de nervi tibial a l'objectiu de 10x (per la mesura de l'àrea de la secció de tot el nervi), i després es capten imatges de diferents camps, de la secció de nervi tibial, a l'objectiu de 100x a l'oli d'immersió, a partir de les quals es realitzen les morfometries de fibres mielinitzades, i s'analitzen els paràmetres com: el nombre d'axons, el nombre fibres mielinitzades per nervi, el perímetre i l'àrea de les fibres mielinitzades.

S'imprimeixen a l'atzar els diferents camps de nervi captats i es comptabilitzen com a mínim unes 300 fibres mielíniques per secció de nervi. Per aquest procediment s'utilitza una tauleta digital Intuous[®] 3 A4 (WACOM) juntament amb un llapis magnètic. Es ressegueix el perfil exterior i interior de cada fibra, i s'avaluen els paràmetres morfomètrics de l'àrea i el diàmetre de la fibra, àrea i diàmetre de l'axó, el gruix de la mielina (g ratio) i la densitat de fibres mielinitzades, mitjançant el software Object Image (Ceballos *et al.*, 1999).

4.9. Tècniques d'obtenció i manipulació de RNA i DNA de ratolí

4.9.1. Extracció de DNA genòmic de ratolí

Partim de mostres de teixit fresc de ratolí (nervi ciàtic, ganglis de l'arrel dorsal i medul·la espinal). Es digereix el teixit amb un tampó que conté detergent necessari per solubilitzar membranes i així disgregar el teixit, amb un volum final per mostra de 1,2ml de tampó per 100mg de teixit. La solució s'incuba O/N a 55°C en agitació suau. Es centrifuguen les mostres 15 minuts a 4500xg i es recupera el sobrenedant a un tub nou. Per purificar el DNA genòmic s'utilitza un solvent orgànic el fenol-cloroform-isoamílic (25:24:1), el qual s'afegeix a un volum equivalent al volum inicial de la mostra disgregada. Es vorteja la barreja solvent orgànic-mostra, s'incuba 5 minuts a temperatura ambient i seguidament es centrifuga a 2500g durant 15 minuts per separar les dos fases. Es recupera la fase superior, el sobrenedant (conté el DNA) i es transfereix a un tub net, seguidament s'inicia el procés de purificació del DNA. Aquest es

precipita afegint 2 volums d'etanol 100% i ½ volums de acetat sòdic 3M i ràpidament observem la formació de la medusa de DNA (per una millor precipitació del DNA es mantenen els tubs a -80°C O/N). Es centrifuguen 15 minuts a 4500xg i es descarta el sobrenedant. Es renta el precipitat amb etanol 70%, es decanta i es deixa assecar a temperatura ambient. Per solubilitzar el DNA s'afegeix un volum entre 50-100 µl d'aigua estèril amb RNAsa a una concentració final de 100mg/ml, depenent del pellet obtingut. La concentració de DNA obtinguda es mesura espectrofotomètricament amb el Nanodrop seguint els passos descrits a l'apartat 2.2.4. i es mantenen a -20°C fins a la seva utilització.

Reactius i solucions

Tampó de digestió: 100mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH:8,0, 25mM EDTA pH:8,0, 0,6% SDS i 200µg/ml proteinasa K (Sigma-Aldrich).

4.9.2. Obtenció de DNA viral

Dels animals sotmesos a injecció intratecal (apartat 4.5) se'ls realitza extracció de líquid cefaloraquídi (LCR) (apartat 4.5.1.). Les mostres de LCR obtingudes se sotmeten al protocol descrit per (Segura *et al.*) que ens permet obtenir el DNA viral present a LCR dels ratolins injectats. El primer pas consisteix realitzar un tractament amb l'enzim DNAsa per degradar la càpside viral. Partim de 2µl de LCR on s'afegeixen 12,7µl d'aigua estèril (B.Braun) més 1,8µl del tampó de DNAsa 10x, 1µl de DNAsa (1U/µl), s'incuba a 37°C 1 hora, seguit d'una segona incubació a 75°C durant 30 minuts per inactivar la DNAsa, el procés es continua amb un segon tractament amb proteinasa K, s'incuba a 37°C 1 hora i s'inactiva la proteinasa K 20 minuts a 95°C. Per últim es realitza una dilució 1/10 de les mostres i s'analitza la presència de DNA viral a LCR mitjançant RT-PCR (PCR en temps real).

Reactius i solucions

DNAsa (Promega), proteinasa K (Sigma-Aldrich)

Tampó DNAsa : Tris-HCl 10mM, MgCl₂·6H₂O, pH 7,5

Tampó proteinasa K: 0,5% SDS, EDTA 10mM.

4.9.3. Obtenció de RNA total de teixit de ratolí

L'extracció de RNA de teixit nerviós es divideix en dos passos, el primer pas consisteix en l'homogeneïtzació de la mostra. Durant tot aquest primer pas les mostres es mantenen constantment en fred. Inicialment s'afegeix 1ml de *Qiazol* per gram de teixit, s'homogeneïtza la mostra mitjançant un èmbol (Eppendorf) i es manté a -80°C 24 hores. Es centrifuga 15 minuts a

12000g a 4°C, es recupera el sobrenedant a un tub nou i s'afegeixen 0,2ml de cloroform per cada ml de *Qiazol* utilitzat, es vorteja 15 segons i s'incuba 2 minuts a temperatura ambient. Es centrifuga 15 minuts a 12000g a 4°C, i es recupera la fase aquosa de cada mostra. S'afegeix 0,7 volums d'isopropanol per cada ml de *Qiazol* utilitzat i s'incuba 10 minuts a temperatura ambient. Es centrifuguen les mostres 10 minuts a 12000g a 4°C. Es renta el pellet amb etanol 70% (amb aigua tractada amb DEPC) a 1ml per cada ml de *Qiazol* utilitzat, es centrifuga 5 minuts a 7500g a 4°C. Es deixa assecar el pellet de RNA obtingut i es resuspèn amb aigua pretractada amb DEPC. Per últim es mesura la concentració de RNA de cada mostra espectrofotomètricament amb el Nanodrop (apartat 2.2.4), les mostres mantenen a -80°C.

Reactius i solucions

Qiazol (Qiagen)

Per preparar l'aigua-DEPC es posa el volum necessari d'aigua en un recipient lliure de RNAses (vidre pyrex, 3h a 250°C), se li afegeix el DEPC fins 0,01% (v/v), i s'incuba O/N a 37°C, posteriorment s'autoclava 2 cops per inhibir el DEPC (dietil pirocarbonat) (Sigma-Aldrich).

4.9.4. Anàlisi de RNA i DNA per Real-Time PCR

La tècnica Real-time PCR o PCR en temps real s'utilitza per quantificar diferències en l'expressió del mRNA i per quantificar els nivells d'infectivitat *in vivo* dels vectors virals utilitzats (AAVs, ssDNA). Es basa en la utilització d'un termociclador espectrofluoromètric i una molècula anomenada *sybrgreen* (conté KCl i (NH)₄SO₄, que proporciona una elevada especificitat d'unió). Aquesta molècula només s'intercala entre les cadenes dobles de DNA (dsDNA). Quan s'uneix al dsDNA emet fluorescència que és detectada per el termociclador, durant la reacció de PCR a la fase d'elongació de les cadenes.

Per poder quantificar el mRNA d'una mostra, inicialment s'ha d'obtenir el RNA total. A partir de RNA total es realitza la retrotranscripció del mRNA per obtenir cDNA, mitjançant el kit Omniscript RT Kit, juntament amb oligodT, inhibidors de RNase i 1µg de RNA total de la nostra mostra, seguint el protocol adjunt en el kit.

La reacció de RT-PCR es realitza seguint el protocol facilitat pel fabricant. De cada mostra a analitzar es realitzen duplicats. Partim d'una dilució 1/10 de cada cDNA juntament amb el FastStart Sybrgreen Master i el parell de encebadors específics (Fwd/Rv) de cada gen a analitzar, i es realitza la Real-Time PCR en el termociclador espectrofluoromètric.

Protocol de RT-PCR per mostres de RNA:

5 minuts a 95°C

45 cicles $\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ segons a } 95^\circ\text{C} \\ 30 \text{ segons a } 58^\circ\text{C} \\ 30 \text{ segons a } 72^\circ\text{C} \end{array} \right.$

Per quantificar el RNA de les mostres analitzades s'utilitza el valor de Ct (*threshold cycle*) obtingut que equival al cicle de la reacció de PCR on la fluorescència que detecta el termociclador supera un nivell llindar establert prèviament, igual a totes les mostres i experiments. El mRNA de referència és l'RNA mitocondrial del gen 36B4 de ratolí. Mitjançant la fórmula (Pfaffl, 2001 #53), s'obtenen els resultats d'expressió relativa:

$$= \frac{2^{(\text{mitja } C_t \text{ gen intrés mostres control} - C_t \text{ gen intrés mostres problema})}}{2^{(\text{mitja } C_t \text{ gen control mostres control} - C_t \text{ gen control mostres problema})}}$$

Quant a la quantificació del nombre de còpies de DNA viral, partim de 2µl d'una dilució 1/10 del DNA juntament amb el FastStart Sybrgreen Master i el parell d'encebadors específics (Fwd/Rv) de cada gen a analitzar. Per cada genoma viral, es realitza una recta patró a partir de la solució viral estoc de concentració coneguda (vg/ml). Es fan dilucions seriades de 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² i 10¹ vg/µl i una cop quantificades al termociclador s'obté una recta de regressió a partir de la qual podem interpolar les Ct obtingudes per cada mostra problema i, obtenir la concentració final de la mostra en vg/ml.

Protocol per RT-PCR de DNA viral:

5 minuts a 95°C

40 cicles $\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ segons a } 95^\circ\text{C} \\ 30 \text{ segons a } 60/62^\circ\text{C}^* \\ 30 \text{ segons a } 72^\circ\text{C} \end{array} \right.$

* Varia en funció de la TM (Temperatura Melting) del encebadors.

Encebadors RNA (cDNA):

	<i>Fwd</i>	<i>Rv</i>
m36B4	<i>atgggtacaagcgcgtcctg</i>	<i>agccgcaaatgcagatggat</i>
IGF-I	<i>ggaccagagaccctttgcgg</i>	<i>gtgccctccgaatgctggag</i>
P0	<i>tctcaggtcacgctctatgtc</i>	<i>caggtagaagagcaacagcag</i>
PMP22	<i>ctcttgtggggatcctgttc</i>	<i>aaggcggatgtggtacagtc</i>
MBP	<i>ggtgcgccaagcggggc</i>	<i>acttctggggcagggagcc</i>
MAG	<i>agcacagcgtcctggacatc</i>	<i>ggcccagccagctcagctc</i>
GAP43	<i>agcctaacaagccgatgtgcc</i>	<i>ttcgtctacagcgttttctctcc</i>

Encebadors DNA:

	<i>Fwd</i>	<i>Rv</i>
CMV	<i>tcccggtgtcttctatggagg</i>	<i>caactccgccccattgacgca</i>
WPRE	<i>atcaacctctggattac</i>	<i>ggattatacaaggagga</i>
Ciclofilina B	<i>tcaacctctctctctgcc</i>	<i>ggtttctccacttcgatcttgc</i>

Reactius

Omniscript RT Kit (Qiagen), oligodT (Invitrogen), RNase inhibitor (NewEngland Biolabs), Maxima TM SYBR/ ROX qPCR Master Mix (Fermentas).

Material

Smart Cyclers reaction tubes, Termociclador espectrofluoromètric Smart Cyclers II (Bio-Rad).

5. TÈCNiques DE MANIPULACIÓ I OBTENCIÓ DE PROTEÏNES

5.1. Obtenció de proteïnes totals de teixit de ratolí

Les mostres obtingudes de teixit fresc i congelades amb nitrogen líquid, conservades a -80°C es deixen descongelar en gel, llavors s'afegeix el tampó de lisi RIA: 300µl per cada tres ganglis de l'arrel dorsal (DRG), 350µl per nervi ciàtic i 500µl per medul·la espinal. Tot el procés d'extracció es realitza a una temperatura constant de 4°C. Els teixits s'homogeneïtzen mitjançant sonicació, (5-10 pulsos de 10 segons a 30 Ampers). El procés d'homogeneització del teixit es realitza en 2-3 intervals de sonicació-gel per evitar l'escalfament de la mostra. Posteriorment les mostres es centrifuguen a 12000g 15-20 minuts i es transfereix el sobrenedant a un tub net i es manté a -20°C fins a la seva quantificació i/o utilització.

Reactius i solucions

Tampó RIA: 50mM Tris-Cl pH7,4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,25% Deoxicolat sòdic, inhibidors de proteases (Roche)

Material

Sonicador: Ultrasonic Processor (SONICS VIBRA CELL™)

5.2. Quantificació de proteïnes

Tots els extractes de proteïna s'han quantificat seguint el mètode colorimètric BCA™ Protein Assay Kit (Pierce). Aquest mètode està basat amb la capacitat que té l'àcid bicinconínic (BCA) de quelar els ions de Cu^+ resultants de la reducció del Cu^{2+} a Cu^{1+} per part dels enllaços peptídics de les proteïnes en solució alcalina (reacció de biuret). La quelació dels ions de Cu^{1+} per cada 2 molècules de BCA afavoreix el viratge de la solució verdsosa a lila intens que absorbeix a 562nm.

Partim d'una recta patró per la quantificació de proteïnes que consisteix en dilucions seriades d'un estoc de BSA (Albúmina sèrica bovina 2mg/ml) des de 2mg/ml fins a 125 µg/ml. El volum final de cada dilució es de 20µl (10µl vial + 10µl d'aigua). Es realitza una dilució de les mostres a quantificar si és necessari (1/3, 1/5 o 1/10) per què els valors obtinguts entrin dins la recta patró. Preparam 40µl de *Working reagent* per cada dilució de la recta patró i per cada mostra a quantificar. Es barregen 50 parts de BCA™ Reagent A amb 1 part de BCA™ Reagent B (50 A: 1 B). Afegim 2µl de mostra a la solució final de 40µl de *Working reagent*, s'incuben les mostres a 37°C 30 minuts i es mesura l'absorbància al Nanodrop. Primer es mesura la recta

patró, a partir de la qual s'interpolen les mesures de les diferents mostres problema i s'obté la concentració de proteïnes de cada mostra (mg/ml).

5.3. Anàlisi de proteïnes mitjançant Western Blot

La tècnica de western blot ens permet detectar específicament proteïnes procedents dels extractes de teixit segons la seva Mr. Aquesta tècnica consisteix en una electroforesi en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) en gels verticals d'acrilamida que ens permet separar les diferents proteïnes d'una mostra. Aquestes es transfereixen a una membrana de PVDF (GE Healthcare) a partir de la qual podem detectar cada proteïna mitjançant anticossos específics.

La tècnica d'electroforesi SDS-PAGE es basa amb la capacitat de les partícules amb càrrega elèctrica en solució de migrar a diferent velocitat quan són sotmeses a un camp elèctric. La presència d'un detergent aniónic com el SDS al tampó de càrrega i la calor fan que les proteïnes es desnaturalitzin, trenquin els enllaços disulfur i es formi un compost SDS-proteïna que permet migrar les proteïnes cap a l'ànode en funció del seu pes molecular. La resolució d'aquest sistema ens permet diferenciar entre proteïnes de diferent pes molecular. S'utilitza un marcador de pes molecular (Fermentas).

5.3.1 Electroforesi desnaturalitzant (SDS-PAGE)

Per les electroforesis en gel d'acrilamida s'utilitzen gels d'acrilamida discontinus formats per un gel concentrador al 3,9% d'acrilamida i un gel separador amb concentració variable l'acrilamida segons el pes molecular de les proteïnes a detectar (entre 10 i el 12% d'acrilamida (Acryl/Bis29:1 40% w/v solution, Amresco) per separar proteïnes entre 16 i 70 KDa) (mètode Laemmli). Per polimeritzar els gel d'acrilamida utilitzem 25µl de persulfat amoni al 10% i 5µl de TEMED (N, N, N', N'-tetrametil-etilen-diamina, Sigma). Les mostres es barregen amb tampó de càrrega 4X i aigua desionitzada si és necessari. Les proteïnes es desnaturalitzen a 98°C 10 minuts, es mantenen en gel 2 minuts abans de carregar les mostres al gel d'acrilamida. Es corren les mostres inicialment a un voltatge inicial de 100V durant 25 minuts per entrar al gel i seguidament a un voltatge de 150V aproximadament 1h15min. Les electroforesis es realitzen en un equip Mini- Protean tetra Cell for ready gel precast gels (Bio-Rad) amb una font de voltatge (Bio-Rad).

Reactius i solucions

Tampó Electroforesi 5X: 15,1g Tris base, 72gr Glicina, SDS 5% afegir aigua destil·lada fins a 1 litre (no ajustar pH).

Tampó de càrrega: 2ml 0,5 Tris HCl pH 6,8, 4ml 10% SDS, 2ml Glicerol, 2ml 1M DTT (dithiothreitol), 200µl Blau de Bromofenol 1%

5.3.2. Electrotransferència

Un cop finalitzada l'electroforesi les proteïnes separades en el gel es transfereixen a una membrana de PVDF. El pas previ a la transferència és l'activació de la membrana amb metanol 30 segons més un rentat d'aigua destil·lada 5 minuts. S'equilibra la membrana activada i el gel d'acrilamida 20 minuts amb tampó de transferència 1x. La transferència realitza en Trans-Bolt® SD *Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (BIO-RAD), seguint el protocol facilitat per el fabricant. La transferència de les proteïnes del gel a la membrana es realitza a 25 volts 45 minuts. Finalitzada la transferència per comprovar que s'ha realitzat correctament, es visualitzaven les proteïnes transferides a la membrana mitjançant vermell ponceau (colorant que tenyeix les proteïnes de manera reversible) durant 3-5 minuts en agitació i s'elimina l'excés de colorant amb rentats d' H₂O_d.

Reactius i solucions

Tampó Transferència 5X: 15,1g Tris base, 72gr Glicina, afegir aigua destil·lada fins a 1 litre, (no ajustar pH). Tampó transferència 1X (200ml T.Transferència 5X + 200ml Metanol + 600ml H₂O dd)

Ponceau 0,5% (Sigma-Aldrich)

5.3.3 Immunodetecció

Transferides les proteïnes a la membrana, aquesta es bloqueja en solució de bloqueig en agitació de 1h a 2h a temperatura ambient, per evitar unions inespecífiques de l'anticòs a la membrana. Després del bloqueig s'incuba la membrana amb l'anticòs primari a la concentració necessària diluït en solució de bloqueig O/N a 4°C en agitació. Es realitzen tres rentats amb TBS-1% Tween-20 de 5 minuts cadascun i s'incuba la membrana amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa durant 1h a temperatura ambient en agitació. Es fan dos rentats amb TBS-1% Tween- 20 i un amb TBS 1x i es procedeix a la detecció.

La detecció es realitza mitjançant el kit ECL Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection system (GE healthcare) seguint les instruccions facilitades pel fabricant. Aquest consisteix en un reactiu quimioluminescent ECL (Enhanced chemiluminescence), el qual conté el substrat luminol (diacilhidrazida cíclica) que en ser oxidat per l'enzim peroxidasa en condicions alcalines i en presència de fenol emet llum com a subproducte de la reacció. Finalment la llum emesa es captura sobre films d'autoradiografia Amersham Hyperfilm™ ECL High

performance chemiluminescence film (GE healthcare) i es revela. Per analitzar els resultats pertinents s'escaneja la banda adient i mitjançant el software de Sygene amb el programa Gene Tools, podem densitometrar la intensitat de la banda obtinguda i realitzar el tractament de dades.

Reactius i solucions

TBS 10x: 30,2g Tris base, 43,8g NaCl, ajustar pH a 7,5-7,9 amb HCl, afegir H₂O destil·lada fins a 500ml. TBS 1X (100ml TBS 10X + 400ml H₂O destil·lada)

Solució de bloqueig: 5% llet desnatada en pols (Asturiana) en TBS1X-Tween 20 0,1% (Sigma-Aldrich)

Taula anticossos utilitzats per la tècnica de Western-Blot (Taula 10):

Anticòs Primari	Dilució	Procedència/ epítop	Temps d'incubació	Casa comercial
Actina	1/500	Conill	1h RT	Sigma-Aldrich #A2066
Akt	1/500	Conill	O/N 4°C	Cell Signaling #9272
Akt-P (Ser473)	1/500	Conill	O/N 4°C	Cell Signaling #9271
GAP43	1/500	Conill	O/N 4°C	Millipore #AB5220
P0	1/500	Conill	O/N 4°C	Abcam #Ab31851
VEGF	1/200	Conill	O/N 4°C	Abcam #Ab46154

Anticòs Secundari	Dilució	Temps d'incubació	Casa comercial
Porc Anti-conill Ig HRP	1/2000	1h RT	DakoCytomation #P0399

5.4. Anàlisi de proteïnes mitjançant Luminometria

Seguint el procediment de l'apartat 3.1.2 s'han extret mostres de nervi ciàtic, ganglis de l'arrel dorsal i medul·la espinal de ratolí.

L'assaig de luminometria ens permet quantificar l'activitat de l'enzim β -galactosidasa del teixit transduït amb el virus corresponent.

Per homogeneïtzar mostres que se sotmeten a l'assaig de luminometria s'utilitza el tampó de lisi del kit Galacto-Light Plus TM System (Applied Biosystems). Depenent del teixit a disgregar el volum del tampó de lisi varia: nervi ciàtic i ganglis (100 μ l) i medul·la espinal

(250µl). S'incuba l'homogenat obtingut 1 hora a 50°C per inactivar l'activitat β-Gal endògena del teixit i així evitar una sobreestimació de l'activitat β-Gal deguda a l'expressió del vector viral. L'assaig es realitza en plaques opaques de color blanc de 96 pous (Costar) especials per luminometria. Per aquest assaig s'utilitza el kit Galacto-Light Plus™ System i seguint el protocol facilitat pel fabricant. Partim d'un volum de 10µl de mostra a analitzar i la lectura de les mesures d'activitat β-Gal es realitza en el fluorímetre Victor-3 Luminoskan RS (Labsystems). El luminòmetre mesura la intensitat de la llum en unitats relatives de luminiscència (RLU), que es corresponen directament a l'activitat de l'enzim β-Galactosidasa, proporcional a l'activitat infectiva dels virus. Les mesures d'activitat es representen en LU/µg de proteïna total.

5.5. ELISA

S'utilitza el kit ELISA (Novozymes, Rat/Mouse IGF-I ELISA, IDS), per quantificar els nivells d'IGF-I presents a LCR. S'analitzen els nivells del factor de creixement IGF-I en mg/ml, vuit setmanes després de l'administració del vector viral que codifica per IGF-I. Per realitzar aquest assaig partim de 2,5 µl de cada mostra de LCR a analitzar, seguint el protocol facilitat pel fabricant.

Material

Lector de plaques: Power Wave HT (BIO-TEK®)

Rentador de plaques: ELx50 Auto Strip Washer (BIO-TEK® instruments, INC)

Software lector de plaques: KC4™ v3.3 (BIO-TEK®)

5.6. Titulació d'anticossos neutralitzants en sèrum de ratolins injectats

Per determinar si la injecció *in vivo* de les diferents preparacions virals genera una resposta immunològica humoral, es va extreure un volum aproximat de 500µl de sang dels animals injectats per punció cardíaca en el moment d'eutanasiar a l'animal. La sang extreta es va centrifugar a 4°C a 13200 rpm 10 minuts i es van obtenir els sèrums corresponents, que es conservaren a -80°C.

Les titulacions es realitzen en cèl·lules 293-QB, en plaques de 96 pous a una confluència del 60%. De cada sèrum es realitzen diferents dilucions amb sèrum control; (concentrat, 1:50, 1:100 i 1:200) per duplicat. A cada dilució el volum final del sèrum és de 8µl més 2µl de la preparació viral a una MOI=1 (Multiplicity of Infection). Es deixa incubar el virus amb el sèrum corresponent 30 minuts a 37°C. Posteriorment s'afegeixen 75µl de medi d'infecció DMEM, 2% FBS, P/S 1% per mostra i s'afegeixen a cada pou. Dos dies després de la infecció es quantifica

l'expressió del gen marcador que codifica per GFP (Green Fluorescen Protein) i es realitza un comptage de cèl·lules verdes per pou mitjançant un microscopi de fluorescència invertit Nikon Inverted Microscope Eclipsa TS100/TS100-F.

Reactius i solucions

Medi de infecció: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)(PAA), 2% FBS (sèrum fetal boví), 1% Penicil·lina/estreptomina.

5.7. immunohistoquímica en teixit de ratolí

La detecció de proteïnes específiques en teixit de ratolí s'ha realitzat principalment en dues regions del sistema nerviós perifèric del ratolí (nervi ciàtic i ganglis de l'arrel dorsal) i a nivell de sistema nerviós central en la regió de la medul·la espinal. A continuació es descriuen els procediments utilitzats per la preparació i obtenció de les mostres i la immunodetecció de la proteïna en seccions de les mostres tractades en aquest treball.

5.7.1. Preparació i obtenció de seccions de cultius organotípics de gangli de l'arrel dorsal

Les mostres obtingudes a partir de cultius organotípics, un cop fixades en PFA 4%, s'inoculen en agarosa al 6% i es processen mitjançant un vibratom (Vibratome series 1000 plus, The vibratome Company, St. Louis, Missouri, USA), per obtenir seccions entre 100 i 150 µm de gruix. Les seccions es mantenen a 4°C en PBS1x fins que es processen per immunodetecció.

La immunodetecció es realitza en flotació en plaques de 96 pous. A cadascun dels pous es disposa la secció a tractar i se sotmet al protocol següent: Inicialment es fa un rentat amb TBS 1x de 10 minuts seguit de dos rentats amb TBS1x més 1,5% Tween-20 durant 10 minuts. Es realitza un bloqueig de la mostra per evitar unions inespecífiques de l'anticòs primari amb la solució de bloqueig (TBS1x + 1,5% tween-20 + 1% BSA) durant 1 hora i 30 minuts. S'incuba la mostra durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari a la dilució pertinent i l'anticòs es dilueix amb la solució de bloqueig. Es fan tres rentats amb TBS1x + 1,5% Tween-20 durant 10 minuts i s'incuba la mostra amb l'anticòs secundari diluït en solució de bloqueig, durant 1 hora a temperatura ambient. Seguidament es fan tres rentats amb TBS1x + 1,5% Tween-20 10 minuts seguit d'1 rentat amb TBS1x 10 minuts. Les mostres es munten en medi de muntatge gel mount (Klein *et al.*), es deixen assecar de 45 minuts a 1 hora i es segellen amb laca d'angles.

* Quan s'utilitzen anticossos on l'espècie d'on procedeix l'anticòs és ratolí, s'utilitza com a solució de bloqueig TBS1x + M.O.M.TM (Mouse Ig Bloquing Reagent, Vector Laboraroties), seguint el protocol facilitat pel fabricant.

Tot el procés es realitza en agitació a 400rpm. Per últim les mostres es mantenen a -20°C fins que es visualitzen i s'analitzen per microscòpia confocal (Leica, DM IRE2).

Reactius i solucions

TBS (0,05 M), pH 7,4-7,6 : Tris-HCl 1M pH 7-8 (50 ml), NaCl 9gr, H₂O miliQ 900ml.

Tampó D-PBS (1X) (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline): 137mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na₂HPO₄·7H₂O 1,7mM KH₂PO₄ pH 7,4.

5.7.2. Preparació i obtenció de seccions de sistema nerviós perifèric

Per obtenir mostres de teixit fixades, prèviament els animals han estat perfosos amb Paraformaldehid (PFA). El percentatge de PFA és del 2% si els teixits a fixar han estat transduïts per vectors virals que contenen el gen LacZ o al 4% si codifiquen pel gen GFP. La perfusió intracardíaca es realitza amb el ratolí profundament anestesià amb Ketamina/Xilacina (100/10mg per kg de pes). Es realitza un tall a nivell abdominal, tallant la dermis, els músculs abdominals i la pleura. Un cop observem les vísceres de l'animal es realitza una incisió al fetge per permetre la sortida del líquid de perfusió. Posteriorment es talla el diafragma i podem injectar l'agulla d'una palometa de 27G, al ventricle esquerra del cor del ratolí. El primer pas és eliminar tota la sang del teixit injectant 2 ml tampó fosfat sòdic, sense que el cor deixi de bategar, i després s'injecta lentament 20 ml de paraformaldehid a la concentració adient. Els teixits fixats s'extreuen delicadament i es submergeixen en PFA O/N a 4°C per assegurar una completa fixació, a continuació es realitzen rentats amb tampó fosfat i es mantenen a 4°C fins al seu processament.

Reactius i solucions

Tampó fosfat sòdic: 19 ml Fosfat monosòdic 0,1M (NaH₂PO₄ · H₂O), 81 ml Fosfat bisòdic 0,1M (Na₂HPO₄ · 2H₂O), pH 7,4.

Paraformaldehid (PFA) (Sigma-Aldrich).

5.7.2.1. Obtenció de seccions de criostat

Els teixits fixats es submergeixen en una solució crioprotectora de sacarosa al 30%, entre 24-48h a 4°C . La inclusió de les mostres es realitza en motlles de plàstic, a la mida adient de la mostra a congelar (cryomold Biopsy, Tissue-Tek®, Sakura) i es cobreix amb medi de congelació O.C.T. En un receptacle amb nitrogen líquid hi posem una cassoleta d'acer inoxidable que conté isopentà fred, es submergeixen lentament en l'isopentà els motlles amb la mostra i l'O.C.T, i es congelen evitant la formació de bombolles al medi de congelació, ja que aquestes podien afectar en el pas següent de processament de les mostres. Els blocs obtinguts s'emmagatzemen a -20°C .

Per realitzar les seccions o talls s'utilitza el criostat (Shandon) a -20°C . Es realitzen talls entre 10 i $20\mu\text{m}$ en funció de la mostra a processar. Els talls es col·loquen en portes tractats prèviament amb silane i finalment es mantenen a -20°C fins a ser utilitzats en assajos d'immunohistoquímica.

Reactius i solucions

Silane: Es submergeixen el portes durant 1 minut en 3-(trimethoxysilyl) propyl metacrylate (Sigma-Aldrich) : acetona (1:50) (Panreac), es renten dos vegades en aigua destil·lada i es deixen assecar O/N 55°C .

O.C.T.TM : Polyvinyl alcohol <11%, Carbowax < 5%, Nonreactive ingredients >85%, (Tissue-Tek®, Sakura).

5.7.2.2 Immunohistoquímica en seccions de criostat

La immunohistoquímica en talls de mostres congelades obtinguts al criostat es realitzen en una cambra humida, per mantenir les mostres hidratades durant tot l'assaig. Es mantenen els portaobjectes amb les mostres corresponents 10-15 minuts a 37°C i es procedeix al protocol següent: Inicialment es fa un rentat amb TBS 1x de 7 minuts seguit de dos rentats amb TBS1x + 0,05% Tween-20 durant 10 minuts. Es realitza un bloqueig de la mostra per evitar unions inespecífiques de l'anticòs primari amb la solució de bloqueig (TBS1x + 0,05% tween-20 + 0,2% BSA) durant 1 hora 30 minuts. S'incuba la mostra durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari a la dilució pertinent, amb la solució de bloqueig. Es fan tres rentats amb TBS1x + 0,05% Tween-20 durant 10 minuts i s'incuba la mostra amb l'anticòs secundari diluït en solució de bloqueig, durant 1 hora a temperatura ambient. Seguidament es fan tres rentats amb TBS1x + 0,05% Tween-20 10 minuts seguit d'un rentat amb TBS1x 10 minuts. Les mostres es munten en medi el medi de muntatge gel mount (Sigma-Aldrich), es deixen assecar de 45 minuts a 1 hora i es segellen amb laca d'ungles.

Finalitzat el procés les mostres es guarden a 4°C fins que es visualitzen i s'analitzen per microscòpia confocal (Leica, DM-IRE2).

Reactius i solucions

TBS (0,05 M), pH 7,4-7,6 : Tris-HCl 1M pH 7-8 (50 ml), NaCl 9gr, H₂O miliQ 900ml.

Taula anticossos per immunohistoquímica (Taula 11):

Anticossos Primaris	OCT/ (Organotípic)	Procedència/ (Epítip)	Temps d'incubació	Casa comercial
APC1	1/400	Ratolí	O/N 4°C	Calbiochem #OP80
CGRP	1/400 (1/300)	Conill	O/N 4°C	Sigma-Aldrich #C8198
ChAt	1/200	Cabra	O/N 4°C	Chemicon #AB144
GFAP	1/500	Conill	O/N 4°C	Dako #Z0334
Iba1	1/1000	Conill	O/N 4°C	Wako #019-1974
IB4	1/200 (1/200)	Lectina	O/N 4°C	Molecular Probes #I21412
IGF-I	1/100	Conill	O/N 4°C	Abcam #Ab40657
NeuN	(1/200)	Ratolí	O/N 4°C	Millipore #MAB377
NF-200	1/400 (1/200)	Conill	O/N 4°C	Sigma-Aldrich #N4142
Periferina	1/400 (1/200)	Conill	O/N 4°C	Chemicon #AB1530
PGP 9.5	1/500	Conill	O/N 4°C	Ultra Clone #RA95101
S100	1/500	Conill	O/N 4°C	Dako #Z0311

Anticossos Secundaris	OCT	Organotípics	Temps d'incubació	Casa comercial
Alexa Fluor 568 Cabra anti-conill	1/200	1/200	1 h RT	Molecular Probes #A11011
Alexa Fluor 568 Cabra anti-ratolí	1/200	1/200	1 h RT	Molecular Probes #A11004
Alexa Fluor 586 Conill anti-cabra	1/200		1 h RT	Molecular Probes #A11078

6. ANÀLISI ESTADÍSTICA I COMPARATIVA DE LES DADES

Els resultats de RT-PCR, Luminometria i Western Blot s'expressen com a mitja \pm error estàndard de la mitja. La comparació es realitza mitjançant la t de Student de dades no aparellades i tests de comparació múltiple Newman-Keuls. Les diferències es consideren estadísticament significatives amb un $*p < 0.05$.

Pels tests electrofisiològics i morfomètrics els resultats es mostren com a mitjana i SEM. Les comparacions estadístiques entre grups es realitzen per ANOVA unidireccional amb un test de Bonferroni post-hoc per a múltiples comparacions.

VIII. BIBLIOGRAFIA

A.

- ADEGHATE, E., RASHED, H., RAJBANDARI, S., and SINGH, J. (2006). Pattern of distribution of calcitonin gene-related Peptide in the dorsal root ganglion of animal models of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 1084, 296-303.
- AGUILAR-REBOLLEDO, F. (2005). Guía clínica "Neuropatía diabética" para médicos. *Plast & Rest Neurol*, 35-37.
- AKKINA, S.K., PATTERSON, C.L., and WRIGHT, D.E. (2001). GDNF rescues nonpeptidergic unmyelinated primary afferents in streptozotocin-treated diabetic mice. *Exp Neurol* 167, 173-182.
- ALI, T.K., MATRAGOON, S., PILLAI, B.A., LIOU, G.I., and EL-REMESSY, A.B. (2008). Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. *Diabetes* 57, 889-898.
- AMICI, S.A., DUNN, W.A., JR., MURPHY, A.J., ADAMS, N.C., GALE, N.W., VALENZUELA, D.M., YANCOPOULOS, G.D., and NOTTERPEK, L. (2006). Peripheral myelin protein 22 is in complex with alpha6beta4 integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina. In *J Neurosci. pp.* 1179-1189.
- AMICI, S.A., DUNN, W.A., JR., and NOTTERPEK, L. (2007). Developmental abnormalities in the nerves of peripheral myelin protein 22-deficient mice. *J Neurosci Res* 85, 238-249.
- ANDREOLETTI, L., HOBER, D., HOBER-VANDENBERGHE, C., BELAICH, S., VANTYGHM, M.C., LEFEBVRE, J., and WATTRE, P. (1997). Detection of coxsackie B virus RNA sequences in whole blood samples from adult patients at the onset of type I diabetes mellitus. *J Med Virol* 52, 121-127.
- APFEL, S.C. (1999). Neurotrophic factors and diabetic peripheral neuropathy. *Eur Neurol* 41 Suppl 1, 27-34.
- APFEL, S.C., SCHWARTZ, S., ADORNATO, B.T., FREEMAN, R., BITON, V., RENDELL, M., VINIK, A., GIULIANI, M., STEVENS, J.C., BARBANO, R., and DYCK, P.J. (2000). Efficacy and safety of recombinant human nerve growth factor in patients with diabetic polyneuropathy: A randomized controlled trial. rhNGF Clinical Investigator Group. *Jama* 284, 2215-2221.
- ARIZA, L. (2010). Estudio de la vía de señalización de NrgtypeIII en el desarrollo de la neuropatía diabética. *Departament de Bioquímica i Biologia molecular*. (Universitat Autònoma de Barcelona).
- ATANASOSKI, S., SCHERER, S.S., SIRKOWSKI, E., LEONE, D., GARRATT, A.N., BIRCHMEIER, C., and SUTER, U. (2006). ErbB2 signaling in Schwann cells is mostly dispensable for maintenance of myelinated peripheral nerves and proliferation of adult Schwann cells after injury. *J Neurosci* 26, 2124-2131.
- ATKINSON, M.A., and EISENBARTH, G.S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221-229.

B.

- BANTEL-SCHAAL, U., and ZUR HAUSEN, H. (1984). Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 134, 52-63.
- BARTLETT, J.S., SAMULSKI, R.J., and MCCOWN, T.J. (1998). Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain. *Hum Gene Ther* 9, 1181-1186.
- BLANKINSHIP, M.J., GREGOREVIC, P., ALLEN, J.M., HARPER, S.Q., HARPER, H., HALBERT, C.L., MILLER, A.D., and CHAMBERLAIN, J.S. (2004). Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther* 10, 671-678.
- BOYD, J.G., and GORDON, T. (2003). Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* 27, 277-324.
- BRADLEY, J.L., THOMAS, P.K., KING, R.H., MUDDLE, J.R., WARD, J.D., TESFAYE, S., BOULTON, A.J., TSIGOS, C., and YOUNG, R.J. (1995). Myelinated nerve fibre regeneration in diabetic sensory polyneuropathy: correlation with type of diabetes. *Acta Neuropathol* 90, 403-410.
- BRANTLY, M.L., CHULAY, J.D., WANG, L., MUELLER, C., HUMPHRIES, M., SPENCER, L.T., ROUHANI, F., CONLON, T.J., CALCEDO, R., BETTS, M.R., SPENCER, C., BYRNE, B.J., WILSON, J.M., and FLOTTE, T.R. (2009). Sustained transgene expression despite T lymphocyte

- responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16363-16368.
- BROWNLEE, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.
- BROWNLEE, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
- BURGER, C., GORBATYUK, O.S., VELARDO, M.J., PEDEN, C.S., WILLIAMS, P., ZOLOTUKHIN, S., REIER, P.J., MANDEL, R.J., and MUZYCZKA, N. (2004). Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* 10, 302-317.
- BUTT, A.J., and WILLIAMS, A.C. (2001). IGF1BP-3 and apoptosis--a license to kill? *Apoptosis* 6, 199-205.
- C.**
- CAMERON, N.E., COTTER, M.A., JACK, A.M., BASSO, M.D., and HOHMAN, T.C. (1999). Protein kinase C effects on nerve function, perfusion, Na(+), K(+)-ATPase activity and glutathione content in diabetic rats. *Diabetologia* 42, 1120-1130.
- CAMERON, N.E., GIBSON, T.M., NANGLE, M.R., and COTTER, M.A. (2005). Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1043, 784-792.
- CARRO, E., TREJO, J.L., GOMEZ-ISLA, T., LEROITH, D., and TORRES-ALEMAN, I. (2002). Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8, 1390-1397.
- CEARLEY, C.N., and WOLFE, J.H. (2006). Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol Ther* 13, 528-537.
- CEBALLOS, D., CUADRAS, J., VERDU, E., and NAVARRO, X. (1999). Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat* 195 (Pt 4), 563-576.
- CIDECIYAN, A.V., HAUSWIRTH, W.W., ALEMAN, T.S., KAUSHAL, S., SCHWARTZ, S.B., BOYE, S.L., WINDSOR, E.A., CONLON, T.J., SUMAROKA, A., PANG, J.J., ROMAN, A.J., BYRNE, B.J., and JACOBSON, S.G. (2009). Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Hum Gene Ther* 20, 999-1004.
- CUI, Q.L., and ALMAZAN, G. (2007). IGF-I-induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases. *J Neurochem* 100, 1480-1493.
- CHATTOPADHYAY, M., KRISKY, D., WOLFE, D., GLORIOSO, J.C., MATA, M., and FINK, D.J. (2005a). HSV-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor to dorsal root ganglia prevents diabetic neuropathy. *Gene Ther* 12, 1377-1384.
- CHATTOPADHYAY, M., MATA, M., GOSS, J., WOLFE, D., HUANG, S., GLORIOSO, J.C., and FINK, D.J. (2007). Prolonged preservation of nerve function in diabetic neuropathy in mice by herpes simplex virus-mediated gene transfer. *Diabetologia* 50, 1550-1558.
- CHATTOPADHYAY, M., WOLFE, D., MATA, M., HUANG, S., GLORIOSO, J.C., and FINK, D.J. (2005b). Long-term neuroprotection achieved with latency-associated promoter-driven herpes simplex virus gene transfer to the peripheral nervous system. *Mol Ther* 12, 307-313.
- CHEN, S., KAPTURCZAK, M., LOILER, S.A., ZOLOTUKHIN, S., GLUSHAKOVA, O.Y., MADSEN, K.M., SAMULSKI, R.J., HAUSWIRTH, W.W., CAMPBELL-THOMPSON, M., BERNS, K.I., FLOTTE, T.R., ATKINSON, M.A., TISHER, C.C., and AGARWAL, A. (2005). Efficient transduction of vascular endothelial cells with recombinant adeno-associated virus serotype 1 and 5 vectors. *Hum Gene Ther* 16, 235-247.
- CHEN, Z.L., YU, W.M., and STRICKLAND, S. (2007). Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* 30, 209-233.
- CHIARELLI, F., SANTILLI, F., and MOHN, A. (2000). Role of growth factors in the development of diabetic complications. *Horm Res* 53, 53-67.
- CHU, Q., MORELAND, R., YEW, N.S., FOLEY, J., ZIEGLER, R., and SCHEULE, R.K. (2008). Systemic Insulin-like growth factor-1 reverses hypoalgesia and improves mobility in a mouse model of diabetic peripheral neuropathy. *Mol Ther* 16, 1400-1408.

D.

- DAVIDSON, B.L., STEIN, C.S., HETH, J.A., MARTINS, I., KOTIN, R.M., DERKSEN, T.A., ZABNER, J., GHODSI, A., and CHIORINI, J.A. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3428-3432.
- DE LA PUENTE, A., GOYA, L., RAMOS, S., MARTIN, M.A., ALVAREZ, C., ESCRIVA, F., and PASCUAL-LEONE, A.M. (2000). Effects of experimental diabetes on renal IGF/IGFBP system during neonatal period in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F1067-1076.
- DE WIT, J., EGGERS, R., EVERS, R., CASTREN, E., and VERHAAGEN, J. (2006). Long-term adeno-associated viral vector-mediated expression of truncated TrkB in the adult rat facial nucleus results in motor neuron degeneration. *J Neurosci* 26, 1516-1530.
- DELGADO-GARCÍA, H.A.J. (2004). *BRAIN Damage and Repair*. (Kluwer Academic Publishers).
- DODGE, J.C., HAIDET, A.M., YANG, W., PASSINI, M.A., HESTER, M., CLARKE, J., ROSKELLEY, E.M., TRELEAVEN, C.M., RIZO, L., MARTIN, H., KIM, S.H., KASPAR, R., TAKSIR, T.V., GRIFFITHS, D.A., CHENG, S.H., SHIHABUDDIN, L.S., and KASPAR, B.K. (2008). Delivery of AAV-IGF-1 to the CNS extends survival in ALS mice through modification of aberrant glial cell activity. *Mol Ther* 16, 1056-1064.
- DREL, V.R., MASHTALIR, N., ILNYTSKA, O., SHIN, J., LI, F., LYZOGUBOV, V.V., and OBROSOVA, I.G. (2006). The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 55, 3335-3343.
- DUDEK, H., DATTA, S.R., FRANKE, T.F., BIRNBAUM, M.J., YAO, R., COOPER, G.M., SEGAL, R.A., KAPLAN, D.R., and GREENBERG, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665.
- DUQUE, S., JOUSSEMET, B., RIVIERE, C., MARAIS, T., DUBREIL, L., DOUAR, A.M., FYFE, J., MOULLIER, P., COLLE, M.A., and BARKATS, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 17, 1187-1196.
- DYCK, P.J., DAVIES, J.L., WILSON, D.M., SERVICE, F.J., MELTON, L.J., 3RD, and O'BRIEN, P.C. (1999). Risk factors for severity of diabetic polyneuropathy: intensive longitudinal assessment of the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. *Diabetes Care* 22, 1479-1486.
- DYCK, P.J., KRATZ, K.M., KARNES, J.L., LITCHY, W.J., KLEIN, R., PACH, J.M., WILSON, D.M., O'BRIEN, P.C., MELTON, L.J., 3RD, and SERVICE, F.J. (1993). The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 43, 817-824.

E.

- EBADI, M., BASHIR, R.M., HEIDRICK, M.L., HAMADA, F.M., REFAEY, H.E., HAMED, A., HELAL, G., BAXI, M.D., CERUTIS, D.R., and LASSI, N.K. (1997). Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int* 30, 347-374.
- EISENBARTH, G.S. (1986). Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314, 1360-1368.
- ELIAS, K.A., CRONIN, M.J., STEWART, T.A., and CARLSEN, R.C. (1998). Peripheral neuropathy in transgenic diabetic mice: restoration of C-fiber function with human recombinant nerve growth factor. *Diabetes* 47, 1637-1642.
- ERLES, K., SEBOKOVA, P., and SCHLEHOFER, J.R. (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 59, 406-411.

F.

- 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.
- FINK, D.J., DELUCA, N.A., YAMADA, M., WOLFE, D.P., and GLORIOSO, J.C. (2000). Design and application of HSV vectors for neuroprotection. *Gene Ther* 7, 115-119.

- FISHER, K.J., JOOSS, K., ALSTON, J., YANG, Y., HAECKER, S.E., HIGH, K., PATHAK, R., RAPER, S.E., and WILSON, J.M. (1997). Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 3, 306-312.
- FLOYD, S., FAVRE, C., LASORSA, F.M., LEAHY, M., TRIGIANTE, G., STROEBEL, P., MARX, A., LOUGHRAN, G., O'CALLAGHAN, K., MAROBBIO, C.M., SLOTBOOM, D.J., KUNJI, E.R., PALMIERI, F., and O'CONNOR, R. (2007). The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth. *Mol Biol Cell* 18, 3545-3555.
- FOUST, K.D., NURRE, E., MONTGOMERY, C.L., HERNANDEZ, A., CHAN, C.M., and KASPAR, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 27, 59-65.
- FOUST, K.D., POIRIER, A., PACAK, C.A., MANDEL, R.J., and FLOTTE, T.R. (2008). Neonatal intraperitoneal or intravenous injections of recombinant adeno-associated virus type 8 transduce dorsal root ganglia and lower motor neurons. *Hum Gene Ther* 19, 61-70.
- FRANCIS, G., MARTINEZ, J., LIU, W., NGUYEN, T., AYER, A., FINE, J., ZOCHODNE, D., HANSON, L.R., FREY, W.H., 2ND, and TOTH, C. (2009). Intranasal insulin ameliorates experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 58, 934-945.
- FU, S.Y., and GORDON, T. (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14, 67-116.

G.

- GAJDA, M., LITWIN, J.A., ADRIAENSEN, D., TIMMERMANS, J.P., and CICHOCKI, T. (2004). Segmental distribution and morphometric features of primary sensory neurons projecting to the tibial periosteum in the rat. *Folia Histochem Cytobiol* 42, 95-99.
- GAO, G., VANDENBERGHE, L.H., ALVIRA, M.R., LU, Y., CALCEDO, R., ZHOU, X., and WILSON, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78, 6381-6388.
- GAO, G.P., ALVIRA, M.R., WANG, L., CALCEDO, R., JOHNSTON, J., and WILSON, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11854-11859.
- GAO, W.Q., SHINSKY, N., INGLE, G., BECK, K., ELIAS, K.A., and POWELL-BRAXTON, L. (1999). IGF-I deficient mice show reduced peripheral nerve conduction velocities and decreased axonal diameters and respond to exogenous IGF-I treatment. *J Neurobiol* 39, 142-152.
- GARAY-SEVILLA, M.E., REGALADO, J.C., MALACARA, J.M., NAVA, L.E., WROBEL-ZASADA, K., CASTRO-RIVAS, A., and WROBEL, K. (2005). Advanced glycosylation end products in skin, serum, saliva and urine and its association with complications of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 28, 223-230.
- GOSS, J.R., GOINS, W.F., LACOMIS, D., MATA, M., GLORIOSO, J.C., and FINK, D.J. (2002). Herpes simplex-mediated gene transfer of nerve growth factor protects against peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetes in the mouse. *Diabetes* 51, 2227-2232.
- GOVINDASAMY, L., PADRON, E., MCKENNA, R., MUZYCZKA, N., KALUDOV, N., CHIORINI, J.A., and AGBANDJE-MCKENNA, M. (2006). Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4. *J Virol* 80, 11556-11570.

H.

- HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., MCCORMACK, M.P., WULFFRAAT, N., LEBOULCH, P., LIM, A., OSBORNE, C.S., PAWLIUK, R., MORILLON, E., SORENSEN, R., FORSTER, A., FRASER, P., COHEN, J.I., DE SAINT BASILE, G., ALEXANDER, I., WINTERGERST, U., FREBOURG, T., AURIAS, A., STOPPA-LYONNET, D., ROMANA, S., RADFORD-WEISS, I., GROSS, F., VALENSI, F., DELABESSE, E., MACINTYRE, E., SIGAUX, F., SOULIER, J., LEIVA, L.E., WISSLER, M., PRINZ, C., RABBITS, T.H., LE DEIST, F., FISCHER, A., and CAVAZZANA-CALVO, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- HADACZEK, P., FORSAYETH, J., MIREK, H., MUNSON, K., BRINGAS, J., PIVIROTTO, P., MCBRIDE, J.L., DAVIDSON, B.L., and BANKIEWICZ, K.S. (2009). Transduction of

- nonhuman primate brain with adeno-associated virus serotype 1: vector trafficking and immune response. *Hum Gene Ther* 20, 225-237.
- HALBERT, C.L., LAM, S.L., and MILLER, A.D. (2007). High-efficiency promoter-dependent transduction by adeno-associated virus type 6 vectors in mouse lung. *Hum Gene Ther* 18, 344-354.
- HARPER, S.Q., STABER, P.D., HE, X., ELIASON, S.L., MARTINS, I.H., MAO, Q., YANG, L., KOTIN, R.M., PAULSON, H.L., and DAVIDSON, B.L. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5820-5825.
- HASBROUCK, N.C., and HIGH, K.A. (2008). AAV-mediated gene transfer for the treatment of hemophilia B: problems and prospects. *Gene Ther* 15, 870-875.
- HOBBA, G.D., FORBES, B.E., PARKINSON, E.J., FRANCIS, G.L., and WALLACE, J.C. (1996). The insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine insulin-like growth factor binding protein-2 (bIGFBP-2) probed by iodination. *J Biol Chem* 271, 30529-30536.
- HOLLIS, E.R., 2ND, KADOYA, K., HIRSCH, M., SAMULSKI, R.J., and TUSZYNSKI, M.H. (2008). Efficient retrograde neuronal transduction utilizing self-complementary AAV1. *Mol Ther* 16, 296-301.
- HOMS J, ARIZA L, UDINA E, NAVARRO X, CHILLÓN M, and BOSCH A. Schwann Cell Targeting Via Intrasciatic Injection of AAV8 as Gene Therapy Strategy for Peripheral Nerve Regeneration.. submitted.
- HOMS J, ARIZA L, VERDÚ E, CASALS L, CHILLÓN M, BOSCH A, and NAVARRO X. Comparative study of peripheral neuropathy and nerve regeneration in NOD an ICR diabetic mice. submitted.
- HOUNSOM, L., and TOMLINSON, D.R. (1997). Does neuropathy develop in animal models? *Clin Neurosci* 4, 380-389.
- I.**
- IESTER, A., VIGNOLA, S., CALLEGARINI, L., GIMELLI, G., and ALPIGIANI, M.G. (1996). [18q syndrome with deficiency of myelin basic protein (MBP)]. *Pediatr Med Chir* 18, 201-205.
- ISNER, J.M., ROPPER, A., and HIRST, K. (2001). VEGF gene transfer for diabetic neuropathy. *Hum Gene Ther* 12, 1593-1594.
- J.**
- JAKUS, V., and RIETBROCK, N. (2004). Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* 53, 131-142.
- JESSEN, K.R. (2004). Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1861-1867.
- JESSEN, K.R., and MIRSKY, R. (2002). Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat* 200, 367-376.
- JESSEN, K.R., and MIRSKY, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6, 671-682.
- JONGEN, J.L., HAASDIJK, E.D., SABEL-GOEDKNEGT, H., VAN DER BURG, J., VECHT CH, J., and HOLSTEGE, J.C. (2005). Intrathecal injection of GDNF and BDNF induces immediate early gene expression in rat spinal dorsal horn. *Exp Neurol* 194, 255-266.
- K.**
- KAMIYA, H., ZHANG, W., EKBERG, K., WAHREN, J., and SIMA, A.A. (2006). C-Peptide reverses nociceptive neuropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 55, 3581-3587.
- KASPAR, B.K., LLADO, J., SHERKAT, N., ROTHSTEIN, J.D., and GAGE, F.H. (2003). Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301, 839-842.
- KATZ, J., WEISS, H., GOLDMAN, B., KANETY, H., STANNARD, B., LEROITH, D., and SHEMER, J. (1995). Cytokines and growth factors modulate cell growth and insulin-like growth factor binding protein secretion by the human salivary cell line (HSG). *J Cell Physiol* 165, 223-227.
- KENNEDY, J.M., and ZOCHODNE, D.W. (2000). The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* 123 (Pt 10), 2118-2129.

- KENNEDY, J.M., and ZOCHODNE, D.W. (2005). Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst* 10, 144-157.
- KIM, J., SCHAFER, J., and MING, G.L. (2006). New directions in neuroregeneration. *Expert Opin Biol Ther* 6, 735-738.
- KIRIK, D., and BJORKLUND, A. (2003). Modeling CNS neurodegeneration by overexpression of disease-causing proteins using viral vectors. *Trends Neurosci* 26, 386-392.
- KIRIK, D., ROSENBLAD, C., BURGER, C., LUNDBERG, C., JOHANSEN, T.E., MUZYCZKA, N., MANDEL, R.J., and BJORKLUND, A. (2002). Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci* 22, 2780-2791.
- KLEIN, R.L., DAYTON, R.D., TATOM, J.B., HENDERSON, K.M., and HENNING, P.P. (2008). AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Mol Ther* 16, 89-96.
- KLUGMANN, M., WYMOND SYMES, C., LEICHTLEIN, C.B., KLAUSSNER, B.K., DUNNING, J., FONG, D., YOUNG, D., and DURING, M.J. (2005). AAV-mediated hippocampal expression of short and long Homer 1 proteins differentially affect cognition and seizure activity in adult rats. *Mol Cell Neurosci* 28, 347-360.
- KUSUMANTO, Y.H., VAN WEEL, V., MULDER, N.H., SMIT, A.J., VAN DEN DUNGEN, J.J., HOOYMANS, J.M., SLUITER, W.J., TIO, R.A., QUAX, P.H., GANS, R.O., DULLAART, R.P., and HOSPERS, G.A. (2006). Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther* 17, 683-691.
- L.**
- LANDON, D.N. (1976). *The Peripheral Nerve*. (Chapman and Hall Ltd).
- LAPOSA, R.R., HENDERSON, J.T., and WELLS, P.G. (2003). Tetracycline-dependent regulation of formamidopyrimidine DNA glycosylase in transgenic mice conditionally reduces oxidative DNA damage in vivo. *Faseb J* 17, 1343-1345.
- LEE, M., BRENNAN, A., BLANCHARD, A., ZOIDL, G., DONG, Z., TABERNERO, A., ZOIDL, C., DENT, M.A., JESSEN, K.R., and MIRSKY, R. (1997). P0 is constitutively expressed in the rat neural crest and embryonic nerves and is negatively and positively regulated by axons to generate non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells, respectively. *Mol Cell Neurosci* 8, 336-350.
- LEIMEROOTH, R., LOBSIGER, C., LUSSI, A., TAYLOR, V., SUTER, U., and SOMMER, L. (2002). Membrane-bound neuregulin1 type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent Progenitor cells. *Dev Biol* 246, 245-258.
- LEROITH, D., WERNER, H., BEITNER-JOHNSON, D., and ROBERTS, C.T., JR. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16, 143-163.
- LEVENTHAL, P.S., SHELDEN, E.A., KIM, B., and FELDMAN, E.L. (1997). Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin-like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance. *J Biol Chem* 272, 5214-5218.
- LEVITES, Y., JANSEN, K., SMITHSON, L.A., DAKIN, R., HOLLOWAY, V.M., DAS, P., and GOLDE, T.E. (2006). Intracranial adeno-associated virus-mediated delivery of anti-pan amyloid beta, amyloid beta40, and amyloid beta42 single-chain variable fragments attenuates plaque pathology in amyloid precursor protein mice. *J Neurosci* 26, 11923-11928.
- LI, Z.G., ZHANG, W., GRUNBERGER, G., and SIMA, A.A. (2002). Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* 946, 221-231.
- LIANG, G., CLINE, G.W., and MACICA, C.M. (2007). IGF-1 stimulates de novo fatty acid biosynthesis by Schwann cells during myelination. *Glia* 55, 632-641.
- LIMBERIS, M.P., VANDENBERGHE, L.H., ZHANG, L., PICKLES, R.J., and WILSON, J.M. (2009). Transduction efficiencies of novel AAV vectors in mouse airway epithelium in vivo and human ciliated airway epithelium in vitro. *Mol Ther* 17, 294-301.
- LIU, G.S., SHI, J.Y., LAI, C.L., HONG, Y.R., SHIN, S.J., HUANG, H.T., LAM, H.C., WEN, Z.H., HSU, K.S., CHEN, C.H., HOWNG, S.L., and TAI, M.H. (2009). Peripheral gene transfer of glial cell-derived neurotrophic factor ameliorates neuropathic deficits in diabetic rats. *Hum Gene Ther* 20, 715-727.

- LIU, J., SAGHIZADEH, M., TULI, S.S., KRAMEROV, A.A., LEWIN, A.S., BLOOM, D.C., HAUSWIRTH, W.W., CASTRO, M.G., SCHULTZ, G.S., and LJUBIMOV, A.V. (2008). Different tropism of adenoviruses and adeno-associated viruses to corneal cells: implications for corneal gene therapy. *Mol Vis* 14, 2087-2096.
- LIU, J.P., BAKER, J., PERKINS, A.S., ROBERTSON, E.J., and EFSTRATIADIS, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.
- LIU, R.Y., and SNIDER, W.D. (2001). Different signaling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth. *J Neurosci* 21, RC164.
- LOILER, S.A., CONLON, T.J., SONG, S., TANG, Q., WARRINGTON, K.H., AGARWAL, A., KAPTURCZAK, M., LI, C., RICORDI, C., ATKINSON, M.A., MUZYCZKA, N., and FLOTTE, T.R. (2003). Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther* 10, 1551-1558.
- LOTERY, A.J., YANG, G.S., MULLINS, R.F., RUSSELL, S.R., SCHMIDT, M., STONE, E.M., LINDBLOOM, J.D., CHIORINI, J.A., KOTIN, R.M., and DAVIDSON, B.L. (2003). Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther* 14, 1663-1671.
- LOW, P.A., NICKANDER, K.K., and TRITSCHLER, H.J. (1997). The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 46 Suppl 2, S38-42.
- LU, Y. (2004). Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review. *Stem Cells Dev* 13, 133-145.
- LUDVIGSON, M.A., and SORENSON, R.L. (1980). Immunohistochemical localization of aldose reductase. I. Enzyme purification and antibody preparation--localization in peripheral nerve, artery, and testis. *Diabetes* 29, 438-449.
- M.**
- MANDRUP-POULSEN, T. (2003). Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 66, 1433-1440.
- MANNA, P., DAS, J., GHOSH, J., and SIL, P.C. (2010). Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IkappaBalpha/NF-kappaB, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radic Biol Med* 48, 1465-1484.
- MARKAKIS, E.A., VIVES, K.P., BOBER, J., LEICHTLE, S., LERANTH, C., BEECHAM, J., ELSWORTH, J.D., ROTH, R.H., SAMULSKI, R.J., and REDMOND, D.E., JR. (2010). Comparative transduction efficiency of AAV vector serotypes 1-6 in the substantia nigra and striatum of the primate brain. *Mol Ther* 18, 588-593.
- MARTINI, R. (1997). Animal models for inherited peripheral neuropathies. *J Anat* 191 (Pt 3), 321-336.
- MARTINI, R., and CARENINI, S. (1998). Formation and maintenance of the myelin sheath in the peripheral nerve: roles of cell adhesion molecules and the gap junction protein connexin 32. *Microsc Res Tech* 41, 403-415.
- MARTINI, R., MOHAJERI, M.H., KASPER, S., GIESE, K.P., and SCHACHNER, M. (1995a). Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J Neurosci* 15, 4488-4495.
- MARTINI, R., ZIELASEK, J., TOYKA, K.V., GIESE, K.P., and SCHACHNER, M. (1995b). Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 11, 281-286.
- MASON, M.R., EHLERT, E.M., EGGERS, R., POOL, C.W., HERMENING, S., HUSEINOVIC, A., TIMMERMANS, E., BLITS, B., and VERHAAGEN, J. (2010). Comparison of AAV serotypes for gene delivery to dorsal root ganglion neurons. *Mol Ther* 18, 715-724.
- MASTROENI, R., BENSADOUN, J.C., CHARVIN, D., AEBISCHER, P., PUJOL, A., and RAOUL, C. (2009). Insulin-like growth factor-1 and neurotrophin-3 gene therapy prevents motor decline in an X-linked adrenoleukodystrophy mouse model. *Ann Neurol* 66, 117-122.
- MCCARTY, D.M., FU, H., MONAHAN, P.E., TOULSON, C.E., NAIK, P., and SAMULSKI, R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 10, 2112-2118.

- MCCARTY, D.M., YOUNG, S.M., JR., and SAMULSKI, R.J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* 38, 819-845.
- MIRSKY, R., PARKINSON, D.B., DONG, Z., MEIER, C., CALLE, E., BRENNAN, A., TOPILKO, P., HARRIS, B.S., STEWART, H.J., and JESSEN, K.R. (2001). Regulation of genes involved in Schwann cell development and differentiation. *Prog Brain Res* 132, 3-11.
- MURAKAMI, T., NAGANO, I., HAYASHI, T., MANABE, Y., SHOJI, M., SETOGUCHI, Y., and ABE, K. (2001). Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene. *Neurosci Lett* 308, 149-152.

N.

- NAVARRO, X., SUTHERLAND, D.E., and KENNEDY, W.R. (1997). Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *Ann Neurol* 42, 727-736.
- NAVE, K.A. (2010). Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 11, 275-283.

O.

- OBROSOVA, I.G. (2005). Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxid Redox Signal* 7, 1543-1552.
- OBROSOVA, I.G., DREL, V.R., PACHER, P., ILNYTSKA, O., WANG, Z.Q., STEVENS, M.J., and YOREK, M.A. (2005). Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited. *Diabetes* 54, 3435-3441.
- OBROSOVA, I.G., ILNYTSKA, O., LYZOGUBOV, V.V., PAVLOV, I.A., MASHTALIR, N., NADLER, J.L., and DREL, V.R. (2007). High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: effects of "healthy" diet and aldose reductase inhibition. *Diabetes* 56, 2598-2608.
- OBROSOVA, I.G., VAN HUYSEN, C., FATHALLAH, L., CAO, X.C., GREENE, D.A., and STEVENS, M.J. (2002). An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *Faseb J* 16, 123-125.
- OZDINLER, P.H., and MACKLIS, J.D. (2006). IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci* 9, 1371-1381.

P.

- PALOMEQUE, J., CHEMALY, E.R., COLOSI, P., WELLMAN, J.A., ZHOU, S., DEL MONTE, F., and HAJJAR, R.J. (2007). Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo. *Gene Ther* 14, 989-997.
- PAN, W., and KASTIN, A.J. (2000). Interactions of IGF-1 with the blood-brain barrier in vivo and in situ. *Neuroendocrinology* 72, 171-178.
- PANEDA, A., VANRELL, L., MAULEON, I., CRETZAZ, J.S., BERRAONDO, P., TIMMERMANS, E.J., BEATTIE, S.G., TWISK, J., VAN DEVENTER, S., PRIETO, J., FONTANELLAS, A., RODRIGUEZ-PENA, M.S., and GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. (2009). Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum Gene Ther* 20, 908-917.
- PARRIZAS, M., SALTIEL, A.R., and LEROITH, D. (1997). Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272, 154-161.
- PASSINI, M.A., BU, J., ROSKELLEY, E.M., RICHARDS, A.M., SARDI, S.P., O'RIORDAN, C.R., KLINGER, K.W., SHIHABUDDIN, L.S., and CHENG, S.H. (2010). CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 120, 1253-1264.
- PASSINI, M.A., WATSON, D.J., VITE, C.H., LANDSBURG, D.J., FEIGENBAUM, A.L., and WOLFE, J.H. (2003). Intraventricular brain injection of adeno-associated virus type 1 (AAV1) in neonatal mice results in complementary patterns of neuronal transduction to AAV2 and total long-term correction of storage lesions in the brains of beta-glucuronidase-deficient mice. *J Virol* 77, 7034-7040.
- PEDRAZA, L., HUANG, J.K., and COLMAN, D.R. (2001). Organizing principles of the axoglial apparatus. *Neuron* 30, 335-344.

- PETRY, H., BROOKS, A., ORME, A., WANG, P., LIU, P., XIE, J., KRETSCHMER, P., QIAN, H.S., HERMISTON, T.W., and HARKINS, R.N. (2008). Effect of viral dose on neutralizing antibody response and transgene expression after AAV1 vector re-administration in mice. *Gene Ther* 15, 54-60.
- PIERSON, C.R., ZHANG, W., and SIMA, A.A. (2003). Proinsulin C-peptide replacement in type 1 diabetic BB/Wor-rats prevents deficits in nerve fiber regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 765-779.
- PLATO, M., KUMMER, W., and HABERBERGER, R.V. (2006). Structural and neurochemical comparison of vagal and spinal afferent neurons projecting to the rat lung. *Neurosci Lett* 395, 215-219.
- PRADAT, P.F., KENNEL, P., NAIMI-SADAOU, S., FINIELS, F., ORSINI, C., REVAH, F., DELAERE, P., and MALLET, J. (2001). Continuous delivery of neurotrophin 3 by gene therapy has a neuroprotective effect in experimental models of diabetic and acrylamide neuropathies. *Hum Gene Ther* 12, 2237-2249.
- PUNGLIA, R.S., LU, M., HSU, J., KUROKI, M., TOLENTINO, M.J., KEOUGH, K., LEVY, A.P., LEVY, N.S., GOLDBERG, M.A., D'AMATO, R.J., and ADAMIS, A.P. (1997). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I. *Diabetes* 46, 1619-1626.
- PURVES, A., FITZPATRICK, HALL, LAMANTIA, MCNAMARA, WILLIAMS. (2004). *Neuroscience*.

R.

- RABINOVSKY, E.D., GELIR, E., GELIR, S., LUI, H., KATTASH, M., DEMAYO, F.J., SHENAQ, S.M., and SCHWARTZ, R.J. (2003). Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *Faseb J* 17, 53-55.
- RIVIERE, C., DANOS, O., and DOUAR, A.M. (2006). Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther* 13, 1300-1308.
- ROSSINI, A.A., APPEL, M.C., WILLIAMS, R.M., and LIKE, A.A. (1977). Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes* 26, 916-920.
- RUSSELL, J.W., CHENG, H.L., and GOLOVOY, D. (2000). Insulin-like growth factor-I promotes myelination of peripheral sensory axons. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 575-584.

S.

- SCHMIDT, M., GROT, E., CERVENKA, P., WAINER, S., BUCK, C., and CHIORINI, J.A. (2006). Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol* 80, 5082-5085.
- SCHMIDT, R.E., DORSEY, D.A., BEAUDET, L.N., FREDERICK, K.E., PARVIN, C.A., PLURAD, S.B., and LEVISETTI, M.G. (2003). Non-obese diabetic mice rapidly develop dramatic sympathetic neuritic dystrophy: a new experimental model of diabetic autonomic neuropathy. *Am J Pathol* 163, 2077-2091.
- SCHNEDL, W.J., FERBER, S., JOHNSON, J.H., and NEWGARD, C.B. (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43, 1326-1333.
- SEGURA, M.M., MONFAR, M., PUIG, M., MENNECHET, F., IBANES, S., and CHILLON, M. (2009). A real-time PCR assay for quantification of canine adenoviral vectors. *J Virol Methods* 163, 129-136.
- SEMENZA, G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64, 993-998.
- SHAW, J.E., DE COURTEN, M., BOYKO, E.J., and ZIMMET, P.Z. (1999). Impact of new diagnostic criteria for diabetes on different populations. *Diabetes Care* 22, 762-766.
- SIMA, A.A. (2003). New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 60, 2445-2464.
- SIMA, A.A., and SUGIMOTO, K. (1999). Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 42, 773-788.

- SIMA, A.A., ZHANG, W., SUGIMOTO, K., HENRY, D., LI, Z., WAHREN, J., and GRUNBERGER, G. (2001). C-peptide prevents and improves chronic Type I diabetic polyneuropathy in the BB/Wor rat. *Diabetologia* 44, 889-897.
- SMITH, E.S., and LEWIN, G.R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195, 1089-1106.
- SRINIVASAN, S., STEVENS, M., and WILEY, J.W. (2000). Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 49, 1932-1938.
- 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.
- STEVENS, M.J., OBROSOVA, I., CAO, X., VAN HUYSEN, C., and GREENE, D.A. (2000). Effects of DL-alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 49, 1006-1015.
- STEWART, H.J., BRADKE, F., TABERNERO, A., MORRELL, D., JESSEN, K.R., and MIRSKY, R. (1996). Regulation of rat Schwann cell Po expression and DNA synthesis by insulin-like growth factors in vitro. *Eur J Neurosci* 8, 553-564.
- STOLL, G., and MULLER, H.W. (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9, 313-325.
- STOREK, B., HARDER, N.M., BANCK, M.S., WANG, C., MCCARTY, D.M., JANSSEN, W.G., MORRISON, J.H., WALSH, C.E., and BEUTLER, A.S. (2006). Intrathecal long-term gene expression by self-complementary adeno-associated virus type 1 suitable for chronic pain studies in rats. *Mol Pain* 2, 4.
- STOREK, B., REINHARDT, M., WANG, C., JANSSEN, W.G., HARDER, N.M., BANCK, M.S., MORRISON, J.H., and BEUTLER, A.S. (2008). Sensory neuron targeting by self-complementary AAV8 via lumbar puncture for chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1055-1060.
- SUGIMOTO, K., MURAKAWA, Y., and SIMA, A.A. (2000). Diabetic neuropathy--a continuing enigma. *Diabetes Metab Res Rev* 16, 408-433.
- SULLIVAN, K.A., HAYES, J.M., WIGGIN, T.D., BACKUS, C., SU OH, S., LENTZ, S.I., BROSIUS, F., 3RD, and FELDMAN, E.L. (2007). Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis* 28, 276-285.
- SULLIVAN, K.A., KIM, B., and FELDMAN, E.L. (2008). Insulin-like growth factors in the peripheral nervous system. *Endocrinology* 149, 5963-5971.
- SUTER, U., and SCHERER, S.S. (2003). Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 4, 714-726.
- T.**
- TAM, J., ROSENBERG, L., and MAYSINGER, D. (2004). INGAP peptide improves nerve function and enhances regeneration in streptozotocin-induced diabetic C57BL/6 mice. *Faseb J* 18, 1767-1769.
- TANDRUP, T. (2004). Unbiased estimates of number and size of rat dorsal root ganglion cells in studies of structure and cell survival. *J Neurocytol* 33, 173-192.
- TAYMANS, J.M., VANDENBERGHE, L.H., HAUTE, C.V., THIRY, I., DEROOSE, C.M., MORTELMANS, L., WILSON, J.M., DEBYSER, Z., and BAEKELANDT, V. (2007). Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther* 18, 195-206.
- TENENBAUM, L., JURYSTA, F., STATHOPOULOS, A., PUSCHBAN, Z., MELAS, C., HERMENS, W.T., VERHAAGEN, J., PICHON, B., VELU, T., and LEVIVIER, M. (2000). Tropism of AAV-2 vectors for neurons of the globus pallidus. *Neuroreport* 11, 2277-2283.
- THOMAS, P.K. (1997). Classification, differential diagnosis, and staging of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes* 46 Suppl 2, S54-57.
- TODA, K., SMALL, J.A., GODA, S., and QUARLES, R.H. (1994). Biochemical and cellular properties of three immortalized Schwann cell lines expressing different levels of the myelin-associated glycoprotein. *J Neurochem* 63, 1646-1657.
- TOMLINSON, D.R., and GARDINER, N.J. (2008). Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 9, 36-45.
- TOPIJKO, P.M., D. (2001). *Glial cell development*.

- TOTH, C., BRUSSEE, V., and ZOCHODNE, D.W. (2006). Remote neurotrophic support of epidermal nerve fibres in experimental diabetes. *Diabetologia* 49, 1081-1088.
- TOTH, C., RONG, L.L., YANG, C., MARTINEZ, J., SONG, F., RAMJI, N., BRUSSEE, V., LIU, W., DURAND, J., NGUYEN, M.D., SCHMIDT, A.M., and ZOCHODNE, D.W. (2008). Receptor for advanced glycation end products (RAGEs) and experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 57, 1002-1017.
- TOWNE, C., PERTIN, M., BEGGAH, A.T., AEBISCHER, P., and DECOSTERD, I. (2009). Recombinant adeno-associated virus serotype 6 (rAAV2/6)-mediated gene transfer to nociceptive neurons through different routes of delivery. *Mol Pain* 5, 52.
- TOWNE, C., SCHNEIDER, B.L., KIERAN, D., REDMOND, D.E., JR., and AEBISCHER, P. (2010). Efficient transduction of non-human primate motor neurons after intramuscular delivery of recombinant AAV serotype 6. *Gene Ther* 17, 141-146.
- U.**
- UNGER, J.W., KLITZSCH, T., PERA, S., and REITER, R. (1998). Nerve growth factor (NGF) and diabetic neuropathy in the rat: morphological investigations of the sural nerve, dorsal root ganglion, and spinal cord. *Exp Neurol* 153, 23-34.
- V.**
- VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M., OESTREICHER, A.B., VAN BERGEN EN HENEGOWEN, P.M., and GISPEN, W.H. (1989). Ultrastructural immunocytochemical localization of B-50/GAP43, a protein kinase C substrate, in isolated presynaptic nerve terminals and neuronal growth cones. *J Neurocytol* 18, 479-489.
- VANDENBERGHE, L.H., WANG, L., SOMANATHAN, S., ZHI, Y., FIGUEREDO, J., CALCEDO, R., SANMIGUEL, J., DESAI, R.A., CHEN, C.S., JOHNSTON, J., GRANT, R.L., GAO, G., and WILSON, J.M. (2006). Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. *Nat Med* 12, 967-971.
- VANDENBERGHE, L.H., WILSON, J.M., and GAO, G. (2009). Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy. *Gene Ther* 16, 311-319.
- VARGAS, M.E., and BARRES, B.A. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* 30, 153-179.
- VASSALLI, G., BUELER, H., DUDLER, J., VON SEGESSER, L.K., and KAPPENBERGER, L. (2003). Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: a comparative study with adenovirus vectors. *Int J Cardiol* 90, 229-238.
- VERGANI, L., DI GIULIO, A.M., LOSA, M., ROSSONI, G., MULLER, E.E., and GORIO, A. (1998). Systemic administration of insulin-like growth factor decreases motor neuron cell death and promotes muscle reinnervation. *J Neurosci Res* 54, 840-847.
- VINCENT, A.M., and FELDMAN, E.L. (2002). Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res* 12, 193-197.
- W.**
- WALTER, H.J., BERRY, M., HILL, D.J., CWYFAN-HUGHES, S., HOLLY, J.M., and LOGAN, A. (1999). Distinct sites of insulin-like growth factor (IGF)-II expression and localization in lesioned rat brain: possible roles of IGF binding proteins (IGFBPs) in the mediation of IGF-II activity. *Endocrinology* 140, 520-532.
- WALWYN, W.M., MATSUKA, Y., ARAI, D., BLOOM, D.C., LAM, H., TRAN, C., SPIGELMAN, I., and MAIDMENT, N.T. (2006). HSV-1-mediated NGF delivery delays nociceptive deficits in a genetic model of diabetic neuropathy. *Exp Neurol* 198, 260-270.
- WANG, A.Y., PENG, P.D., EHRHARDT, A., STORM, T.A., and KAY, M.A. (2004). Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther* 15, 405-413.
- WANG, L.J., LU, Y.Y., MURAMATSU, S., IKEGUCHI, K., FUJIMOTO, K., OKADA, T., MIZUKAMI, H., MATSUSHITA, T., HANAZONO, Y., KUME, A., NAGATSU, T., OZAWA, K., and NAKANO, I. (2002). Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor

- mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 22, 6920-6928.
- WANG, X., WANG, C., ZENG, J., XU, X., HWANG, P.Y., YEE, W.C., NG, Y.K., and WANG, S. (2005a). Gene transfer to dorsal root ganglia by intrathecal injection: effects on regeneration of peripheral nerves. *Mol Ther* 12, 314-320.
- WANG, Z., and GLEICHMANN, H. (1998). GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47, 50-56.
- WANG, Z., ZHU, T., QIAO, C., ZHOU, L., WANG, B., ZHANG, J., CHEN, C., LI, J., and XIAO, X. (2005b). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* 23, 321-328.
- WEBBER, C., and ZOCHODNE, D. (2010). The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp Neurol* 223, 51-59.
- WRABETZ, L., D'ANTONIO, M., PENNUTO, M., DATI, G., TINELLI, E., FRATTA, P., PREVITALI, S., IMPERIALE, D., ZIELASEK, J., TOYKA, K., AVILA, R.L., KIRSCHNER, D.A., MESSING, A., FELTRI, M.L., and QUATTRINI, A. (2006). Different intracellular pathomechanisms produce diverse Myelin Protein Zero neuropathies in transgenic mice. *J Neurosci* 26, 2358-2368.
- WRABETZ, L., FELTRI, M.L., QUATTRINI, A., IMPERIALE, D., PREVITALI, S., D'ANTONIO, M., MARTINI, R., YIN, X., TRAPP, B.D., ZHOU, L., CHIU, S.Y., and MESSING, A. (2000). P(0) glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves. *J Cell Biol* 148, 1021-1034.
- WRIGHT, A., and NUKADA, H. (1994). Sciatic nerve morphology and morphometry in mature rats with streptozocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol* 88, 571-578.
- X.**
- XIA, H., MAO, Q., ELIASON, S.L., HARPER, S.Q., MARTINS, I.H., ORR, H.T., PAULSON, H.L., YANG, L., KOTIN, R.M., and DAVIDSON, B.L. (2004). RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10, 816-820.
- XIAO, W., BERTA, S.C., LU, M.M., MOSCIONI, A.D., TAZELAAR, J., and WILSON, J.M. (1998a). Adeno-associated virus as a vector for liver-directed gene therapy. *J Virol* 72, 10222-10226.
- XIAO, X., LI, J., MCCOWN, T.J., and SAMULSKI, R.J. (1997). Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system. *Exp Neurol* 144, 113-124.
- XIAO, X., LI, J., and SAMULSKI, R.J. (1998b). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72, 2224-2232.
- XU, G., and SIMA, A.A. (2001). Altered immediate early gene expression in injured diabetic nerve: implications in regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 972-983.
- XU, J., MA, C., BASS, C., and TERWILLIGER, E.F. (2005). A combination of mutations enhances the neurotropism of AAV-2. *Virology* 341, 203-214.
- XU, Q.G., MIDHA, R., MARTINEZ, J.A., GUO, G.F., and ZOCHODNE, D.W. (2008). Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. *Neuroscience* 152, 877-887.
- XU, Y., GU, Y., WU, P., LI, G.W., and HUANG, L.Y. (2003). Efficiencies of transgene expression in nociceptive neurons through different routes of delivery of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 14, 897-906.
- Y.**
- YAGIHASHI, S., YAMAGISHI, S.I., WADA, R.I., BABA, M., HOHMAN, T.C., YABE-NISHIMURA, C., and KOKAI, Y. (2001). Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. *Brain* 124, 2448-2458.
- YAMAGISHI, S., UEHARA, K., OTSUKI, S., and YAGIHASHI, S. (2003). Differential influence of increased polyol pathway on protein kinase C expressions between endoneurial and epineurial tissues in diabetic mice. *J Neurochem* 87, 497-507.
- YE, P., LI, L., RICHARDS, R.G., DIAUGUSTINE, R.P., and D'ERCOLE, A.J. (2002). Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice. *J Neurosci* 22, 6041-6051.

- YIN, X., CRAWFORD, T.O., GRIFFIN, J.W., TU, P., LEE, V.M., LI, C., RODER, J., and TRAPP, B.D. (1998). Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 18, 1953-1962.
- YU, W.M., YU, H., CHEN, Z.L., and STRICKLAND, S. (2009). Disruption of laminin in the peripheral nervous system impedes nonmyelinating Schwann cell development and impairs nociceptive sensory function. *Glia* 57, 850-859.
- Z.**
- ZHENG, H., QIAO, C., WANG, C.H., LI, J., LI, J., YUAN, Z., ZHANG, C., and XIAO, X. (2010). Efficient retrograde transport of adeno-associated virus type 8 to spinal cord and dorsal root ganglion after vector delivery in muscle. *Hum Gene Ther* 21, 87-97.
- ZHUANG, H.X., SNYDER, C.K., PU, S.F., and ISHII, D.N. (1996). Insulin-like growth factors reverse or arrest diabetic neuropathy: effects on hyperalgesia and impaired nerve regeneration in rats. *Exp Neurol* 140, 198-205.
- ZINCARELLI, C., SOLTYS, S., RENGO, G., and RABINOWITZ, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16, 1073-1080.
- ZOCHODNE, D.W. (2000a). Diabetic Neuropathies. *Curr Treat Options Neurol* 2, 23-30.
- ZOCHODNE, D.W. (2000b). The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl* 9, S33-38.
- ZOCHODNE, D.W., and CHENG, C. (2000). Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips. *J Anat* 196 (Pt 2), 279-283.

Sotmès a *Gene Therapy*

Schwann Cell Targeting Via Intrasciatic Injection of AAV8 as Gene Therapy Strategy for Peripheral Nerve Regeneration

Judit Homs^{1,2}, Lorena Ariza^{1,2}, Esther Udina^{3,4}, Xavier Navarro^{3,4}, Miguel Chillón^{1,2,5} and Assumpció Bosch^{1,2}

¹Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy (CBATEG),

²Department of Biochemistry and Molecular Biology,

³Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, and Institute of Neurosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra,

⁴CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III

⁵Institut Català de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to A.B. (assumpcio.bosch@uab.es): CBATEG, Edifici H, Campus Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Telephone: 34 93 5814203; FAX: 34 93 5814200

Short title: **Schwann cell gene targeting with AAV8**

ABSTRACT

Efficient transduction of the peripheral nervous system (PNS) is required for gene therapy of acquired and inherited neuropathies, neuromuscular diseases and for pain treatment. We have characterized the tropism and transduction efficiency of different AAV pseudotypes after sciatic nerve injection in the mouse. Among the pseudotypes tested, AAV2/1 transduced both Schwann cells and neurons, AAV2/2 infected only sensory neurons and AAV2/8 preferentially transduced Schwann cells. AAV2/8 expression in the sciatic nerve was detected up to 10 weeks after administration, the latest time-point analyzed. The injected mice developed neutralizing antibodies against all AAVs tested; the titers were higher against AAV2/1 than AAV2/2 and were the lowest for AAV2/8, correlating with a higher transgene expression overtime. AAV2/8 coding for ciliary neurotrophic factor (CNTF) led to up-regulation of P0 and PMP22 myelin proteins four weeks after transduction of injured sciatic nerves. Importantly, CNTF-transduced mice showed a significant increase in both GAP43 expression in sensory neurons, a marker of axonal regeneration, and the compound muscle action potential. These results prove the utility of AAV8 as a gene therapy vector for Schwann cells to treat myelin disorders or to improve nerve regeneration.

Keywords: gene therapy, Schwann cells, AAV8 serotype, PNS regeneration, CNTF, AAV tropism.

INTRODUCTION

Efficient gene transfer to the peripheral nervous system (PNS) is critical for gene therapy of inherited and acquired peripheral neuropathies, accelerating peripheral nerve regeneration or pain treatment. The PNS contains different cell types, mostly postmitotic, and their continuous communication is essential for the accurate function of the whole system. For instance, myelination of the peripheral axons involves reciprocal interactions between Schwann cells and neurons. Thus, while axonal signals regulate myelin production, myelin, synthesized by Schwann cells, regulates axonal diameter, formation of the nodes of Ranvier and nerve conduction velocity.¹ In this context, overexpression of a therapeutic protein by the appropriate cell type may be crucial to maintain or enhance both, the crosstalk between different cell types and the PNS function.

Specific cell targeting can be achieved by using different viral vectors that can enter a particular cell type through its specific receptor. It can also be accomplished by using a cell-specific promoter directing the transgene expression or by engineering vectors containing cell-specific ligands. Herpes simplex virus-based vectors (HSV) were shown to efficiently transduce sensory neurons when injected subcutaneously in animal models, which has led to the initiation of a phase I clinical trial for pain treatment (for review, see ²). Different serotypes of adeno-associated vectors (AAV) also transduce sensory neurons in the dorsal root ganglia (DRG) through direct administration into the cerebral spinal fluid or via retrograde transport.³⁻⁶ Specific transduction of non-neuronal cell types in the PNS, particularly of Schwann cells, may be of great interest for the treatment of hypo- or demyelinating diseases, diabetic neuropathy or to overexpress trophic factors for nerve regeneration. Transduction with first-generation adenovirus showed a broad but transient tropism in many tissues, including different cell types in the PNS.⁷ On the other hand, initial studies reported that VSV-pseudotyped lentiviral vectors transduced mainly neurons in the central nervous system (CNS).⁸ However, more recent works described the ability of different pseudotypes of lentiviruses to also infect glial cells.⁹⁻¹¹ Among them, transduction of mouse and human Schwann cells has been achieved *in vitro*¹² and *in vivo* in animal models of peripheral nerve trauma.^{13,14}

With the aim to study if AAV vectors are capable of specifically transducing Schwann cells, we tested the biodistribution of AAV1, AAV2 and AAV8 vectors following intraneural administration. Here, we demonstrate that AAV8 mostly infects Schwann cells, while AAV2 has a unique tropism for sensory neurons, and AAV1 transduces both sensory neurons and Schwann

cells when injected into the sciatic nerve of mice. Moreover, we show that AAV8-driven expression of CNTF by mouse Schwann cells increases the expression of myelin protein and improves regeneration of injured sciatic nerve shortly after *in vivo* transduction.

RESULTS

Differential tropism of AAV1, AAV2 and AAV8 after intrasciatic administration

Equal amounts of AAV2/1, AAV2/2 and AAV2/8 pseudotypes (1.8×10^9 viral genomes (vg)) containing the green fluorescent protein (GFP) cDNA driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter were injected into the sciatic nerve of mice (a minimum of 10 animals for each viral serotype). Retrograde transport of AAV vectors into sensory neurons was evaluated in lumbar L4 to L6 DRG of animals euthanized 3 weeks post-administration. GFP expression in sensory neurons was detected in animals injected with AAV2/1 or AAV2/2 but very rare labeled neurons were observed in AAV2/8-injected animals (Fig. 1, arrows). The percentage of GFP positive neurons in DRG sections stained with the pan-neuronal marker PGP9.5, averaged 7.45 ± 1.5 % for AAV2/1, 3.81 ± 1.35 % for AAV2 and only 0.51 ± 0.40 % for AAV8. In addition, AAV1- and AAV8-treated DRG contained GFP-expressing cells that were not labeled for PGP9.5, and had Schwann-cell like morphology (Fig. 1, arrowheads).

Longitudinal sections of the sciatic nerve from the same animals were stained for S100, a Schwann cell marker, or for PGP 9.5 (Fig. 2). We found that AAV2/2 GFP expression was detected exclusively in axons, positive for PGP 9.5, AAV2/1-driven GFP expression was seen in axons and Schwann cells, and AAV2/8 targeted mostly Schwann cells. Half-log lower dose of AAV2/8 vector was injected in the sciatic nerve of another group of animals and co-localization was again confirmed by S100 immunohistochemistry, although with lower efficiency (data not shown) suggesting that this particular tropism is not due to saturation of viral receptors.

Recently, Klein and colleagues described that AAV8 tropism in the CNS is modified depending on the method of purification used. While AAV8 vectors purified by iodixanol gradient infected exclusively neurons, CsCl-purification changed AAV8 tropism to glial cells.¹⁵ We performed intrasciatic injections using 8×10^6 green fluorescent units (gfu) of CsCl- or iodixanol-purified AAV8GFP vectors to compare their tropism in the PNS. Three weeks later, GFP mRNA was mostly detected in the sciatic nerve, where nuclei of Schwann cells but not neurons are located, regardless of the purification method employed. However, GFP mRNA levels in the sciatic nerve were higher with CsCl-purified than with iodixanol-purified AAV8 vector. On the other hand, we could hardly detect GFP mRNA in DRG from animals injected with both AAV8 vectors,

indicating that at least through nerve administration, AAV8 transduces mainly Schwann cells, independently of the method of purification (Fig. S1, supplementary information).

Long-term expression of AAV vectors in Schwann cells

AAV2-driven expression in the sciatic nerve peaks at 3 weeks post-administration and it is maintained for at least 6 months.¹⁶ To determine the stability of expression mediated by AAV1 or AAV8 vectors in Schwann cells, we administered 2.2×10^9 vg of the two serotypes coding for the LacZ gene under the expression of a CMV promoter into the sciatic nerve. Expression was quantified by galactolight assay on sciatic nerve protein extracts at 1, 3, 6 and 10 weeks after administration. As shown in Fig. 3A, β -galactosidase expression peaks at week 3 for both serotypes and is maintained for AAV8 for at least 10 weeks, whereas for AAV1 the expression is markedly decreased after 6 weeks.

Both viruses drove expression through the same promoter, thus it seems unlikely that the decrease in AAV1-directed expression in the sciatic nerve would be due to CMV silencing. To test this hypothesis, vector copy number in the peripheral nerve was analyzed in another cohort of animals injected with 1.5×10^9 vg of AAV1CMVGFP or AAV8CMVGFP, and euthanized at 1, 6 and 10 weeks. Vector DNA quantification by real time PCR in sciatic nerves showed a ~12-fold difference in viral copy number/cell between AAV1 and AAV8 at 1 week after transduction (Fig. 3B). The significant difference was maintained at 6 and 10 weeks for both serotypes despite more than 80% decrease in the number of AAV DNA copies overtime. Efficiency of AAV8 transduction in the sciatic nerve is outlined by the fact that the number of vg/cell of AAV8 at week 10 is still higher than those of AAV1 at week 1.

Development of neutralizing antibodies following intrasciatic AAV administration

AAV vectors were shown to be significantly less immunogenic than adenoviral vectors.¹⁷ However, recent studies demonstrated a direct correlation between the virus immunogenicity and its ability to infect dendritic cells, which was superior for AAV2 than for AAV8 serotype.¹⁸ Immune response directed against adenoviral or AAV vectors is developed after intracranial injection in the CNS in a dose-dependent manner. Basically, if the viral vectors escape from the CNS to peripheral organs, a systemic adaptive anti-viral immune response mediates an almost complete elimination of the transgene expression from the brain (for a review, see ¹⁹). Blood-brain-barrier confers a particular immunological privilege to the CNS, however this may not be the case for the PNS since the blood-nerve-barrier is more permeable.

Immune response activation in AAV-transduced sciatic nerves was analyzed on histological slides of sciatic nerves 1-week after transduction without evidence of T cell infiltration (Supplementary Fig. S2). At the same time point, inguinal lymph node morphology showed primary lymph follicles in AAV-injected animals but no secondary follicles, indicative of B lymphocyte proliferation (Supplementary Fig. S3). Altogether, these data suggest that CTL response was not reducing AAV-mediated expression in Schwann cells, which is consistent with the peak expression at 3 weeks post-infection for both AAV1 and AAV8 pseudotypes.

To explore the possibility of re-infection of sciatic nerve with AAV vectors, we quantified the levels of circulating neutralizing antibodies present in the blood of AAV-transduced animals. We plotted the percentage of viral infectivity inhibition after incubation with serum of transduced animals, which correlated with the level of neutralizing antibodies (Fig. 4). Twenty-seven percent inhibition was observed with a 1:50 dilution of serum from AAV8-infected animals, and with a 1:200 dilution of serum from AAV2-injected mice. More importantly, using serum from AAV1-transduced animals we did not obtain 50% infection even at the highest serum dilution. Thus, titers of neutralizing antibodies generated after intrasciatic administration were significantly higher in AAV1-transduced animals than in AAV2-injected mice, with the lowest titer corresponding to animals injected with AAV8 (Fig. 4). We also observed a dose-response inhibition in animals injected with half-log lower dose of AAV8, where more than 50% expression is obtained already with the undiluted serum.

AAV8CNTF-transduced Schwann cells promote axonal regeneration and myelin proteins overexpression in injured sciatic nerve

To test whether AAV8 could have a therapeutic potential in a mouse model of PNS regeneration, we injected 3.6×10^9 vg of AAV1 or AAV8CMVLacZ into the sciatic nerve of mice that had undergone nerve crush. β -galactosidase activity was detected in sciatic nerve protein extracts at 1, 3, 6 and 10 weeks after administration (Fig. 5). Similar to what was shown for intact nerves, the decrease in AAV8-driven expression overtime is significantly lower than for AAV1.

With the aim of stimulating myelin protein expression by Schwann cells, we cloned the mouse CNTF cDNA into an AAV backbone under the regulation of a CAG promoter. Bioactivity of our CNTF construct is demonstrated in the RT4-DP6 Schwann cell line by quantitative RT-PCR of myelin proteins (Supplemental Fig. S4). Significantly higher levels of CNTF correlated with a 2.5-fold increase in P0 and a 1.7-fold increase in PMP22 in the transfected cells.

Next, 4.5×10^9 vg of AAV8CNTF or AAV8GFP were administered into the crushed sciatic nerve of mice. Animals were evaluated at 17, 24 and 30 days post injury. A tendency for

improved regeneration was seen at 17 and 24 days in CNTF-treated animals, with significant differences achieved at 30 days, as indicated by the higher amplitude of the CMAPs compared to GFP-treated mice (Table 1). Increased CNTF immunoreactivity was found in Schwann cells of CNTF-transduced animals compared with GFP-injected nerves (Fig. 6A). Moreover, the augmented CNTF mRNA in Schwann cells resulted in two-fold higher levels of P0 and PMP22 mRNA in the sciatic nerve (Fig. 6B), which agrees with the levels of myelin proteins obtained *in vitro* (Fig. S4). On the other hand, CNTF not only stimulated myelin protein mRNA transcription but also overexpression of GAP43 by peripheral neurons, since GAP43 mRNA levels in L4-L6 DRG were twice higher than in GFP-treated mice (Fig. 6B). GAP43 is a protein overexpressed by neurons in the process of regeneration and it is located in the growth cones of regenerating axons.

DISCUSSION

Gene transfer to the CNS has been extensively studied, but transduction of the PNS by viral vectors still remains a field to be intensely explored. Among the cell types that constitute the PNS, Schwann cells, similar to their homologues in the CNS, the oligodendrocytes, are the supporting cells producing myelin. Currently, many investigations are being focused on these cell types and their role in dysfunctions of the nervous system. For instance, they participate in the development of some neurodegenerative diseases affecting myelination.²⁰ In addition, studies in diabetic patients without evidence of neuropathy showed demyelination without fiber loss or axonal atrophy, suggesting that Schwann cells could be primarily involved in the development of diabetic neuropathy.^{21,22} Moreover, in the PNS, activated Schwann cells are naturally secreting neurotrophic factors essential for nerve regeneration. In this regard, Schwann cells are the only cells producing CNTF in the PNS. Evidence of CNTF autocrine effect on Schwann cells or oligodendrocytes has been reported although data has been controversial. Disrupted CNTF signaling delays myelination of mouse cranial motor neurons,²³ however, CNTF fails to promote myelination *in vivo*.²⁴ Here we show that CNTF gene transfer to Schwann cells increases expression of myelin proteins and activates their differentiation *in vitro* and *in vivo*.

Naturally produced CNTF is non-secreted but it is released to the extracellular space when Schwann cells are lysed after PNS injury. The CNTF receptor, α -ret, is located mainly in neurons, where CNTF has a paracrine effect promoting cell survival and axonal growth.¹² Wild-type CNTF protein lacks the secretion signal sequence.²⁵ To stimulate secretion, many groups have engineered CNTF constructs by adding signal sequences from various secreted proteins.^{12,26} Non-secreted CNTF produced by Schwann cells may have different effects than secreted CNTF.

Indeed, some detrimental effects have been reported following systemic CNTF injection, such as induction of cachexia in mice²⁷ or dose dependent deleterious effects of secreted CNTF in a mouse model of retinal degeneration.²⁸ Thus, expression of CNTF by the appropriate cell type may be crucial to obtain the beneficial effects of this cytokine; among them, the stimulation of nerve regeneration. In contrast to previous works, we did not add any secretion signal to our construct to promote natural expression and release of CNTF by Schwann cells. Our results suggest that overexpression of CNTF by Schwann cells through an AAV8 vector may have both an autocrine effect in Schwann cells by inducing overexpression of myelin proteins, and a paracrine action in neurons, stimulating regeneration of their axons.

The sciatic nerve crush is a well-characterized model of peripheral nerve regeneration. After a lesion, nerve fibers in the distal stump degenerate. Myelin and axon debris are removed by a process called Wallerian degeneration. If the endoneurial tubes remain intact, anatomical and functional recovery is enabled. In the final steps of fiber regeneration, remyelination of the regenerated fibers needs Schwann cells differentiation and myelin protein synthesis. Impairment of peripheral nerve regeneration contributes to peripheral neuropathies in several diseases like diabetes, alcoholism and Charcot-Marie-Tooth, among others. Moreover, speeding peripheral nerve regeneration by gene therapy may also help recovery in traumatic injuries, reducing the painful healing period.

During axonal regeneration, numerous changes in gene expression occur also in the neuronal cell bodies (reviewed in 29). Among them, GAP43 expression in the nerve growth cone is needed for axonal regeneration. We found an increase in GAP43 mRNA in DRG, presumably transcribed by sensory neurons (although we cannot rule out the possibility of satellite cell transduction) but not in the spinal cord, where the somas of motoneurons are located. This may result from a technical limitation due to the dilution of GAP43 mRNA produced by motoneurons in the whole spinal cord tissue that, compared to sensory neurons in DRG, represent a much smaller proportion of cells and thus of mRNA content. Indeed, our electrophysiological data demonstrate improved motor recovery in CNTF injected mice, which is in agreement with previous studies describing its role in stimulation of motoneuron regeneration *in vitro* and *in vivo*.^{30,31}

Intrasciatic administration of AAV8 provides a useful tool for specific Schwann cell transduction, compared to other viral vectors described so far. Through this route of administration we did not observe the neuronal tropism described for this AAV serotype after intracranial injection in the CNS or through intrathecal administration.⁵ Differences in the distribution of AAV8 receptor between axons and soma of sensory neurons may explain this discrepancy. Another possibility would be associated to the particular characteristics of

peripheral neurons, thus any virus entering the axon in the peripheral nerve, needs to retrogradely travel up to the nuclei of the neuron, located in the DRG or the spinal cord, before its genome can be expressed. Differences in the retrograde transport capacity of the different AAV serotypes could also account for their variation in sensory or motor neuron expression.

Despite some experimental variability, expression driven by AAV8 vector is considerably stable as no significant decrease was observed between the peak at 3 weeks and 10 weeks post-administration, the latest time-point analyzed. In contrast, AAV1 expression was dramatically diminished by week 10. Vector copy number per cell was lowered between weeks 1 and 10 for both viruses in the sciatic nerve, but we did not detect inflammation indicative of a T cell response against the transduced cells (Fig. S3). The vector copy number/cell did not exactly correlate with β -galactosidase activity in the sciatic nerve at the same time points (Fig. 4A and B), which could be explained by two reasons. It is possible that a percentage of the vg copies present at week 1 were not expressing the reporter protein yet, since the peak of expression is at week 3. On the other hand, AAV1 also infects sensory neurons, thus, although a nuclear localization signal was used to drive β -galactosidase protein into the nuclei of the producing cells, when expression is strong enough, some β -galactosidase leakage could be found on the cytoplasm and axons of the producing cells. In this case, the β -gal activity detected in the sciatic nerves transduced with AAV1 may be due to both neuronal and Schwann cell expression, while β -gal activity obtained from AAV8 transduction may be exclusive of cells whose nuclei are located in the sciatic nerve, mainly Schwann cells.

Development of circulating antibodies against AAV vectors has been described after intravascular or intramuscular administration. We also detected neutralizing antibodies against the 3 serotypes tested in the serum of injected mice at 3 weeks, but the titers differed among the serotypes. The most immunogenic was AAV1, followed by AAV2 while AAV8-injected mice developed the lowest antibody titers against this vector. As expected, a dose response was observed for AAV8, depending on the titer of virus injected.

In summary, we provide evidence that intranerve administration of AAV8 is a useful tool for local and specific Schwann cell transduction, and it proves to be efficient for stimulating expression of genes involved in peripheral nerve myelination and regeneration in the injured mouse nerve.

MATERIAL AND METHODS

AAV vector construction, production and titration. CNTF cDNA was amplified from mouse sciatic nerve mRNA using the following primers that allow the addition of a *XhoI* and a *BamHI* restriction sites at each end of the amplified fragment (CNTF-Fwd: CTCGAGGGATCCATGGCTTTCGCAGAGCAATCAC, CNTF-Rev: CNTF-Rev: CTCGAGGGATCCCTACATTTGCTTGGCCCCATAA). CNTF cDNA was then cloned into *XhoI* and *BamHI* sites between the ITRs of AAV2, under the regulation of the chicken β -actin promoter and the enhancer of CMV (CAG). The woodchuck hepatitis virus responsive element (WPRE) was added at 3' to stabilize mRNA expression.³²

AAV2/1 and AAV2/8CMV-LacZ as well as AAV2/1, AAV2/2 and AAV2/8 CMV-GFP and AAV2/8CAG-CNTF were generated as previously described³³ by triple transfection of HEK 293-AAV cells (Stratagene, Carlsbad, CA, USA) with branched polyethylenimine (PEI; Sigma, Saint Louis, MO, USA) with the plasmid containing the ITRs of AAV2, the AAV helper plasmid containing Rep2 and Cap for each serotype (kindly provided by JM Wilson, U of Pennsylvania, Philadelphia, USA) and the pXX6 plasmid containing helper adenoviral genes.³⁴ Vectors were purified by CsCl or iodixanol gradients.³³ Encapsidated DNA was quantified by a PicoGreen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) assay following denaturation of the AAV particles (M. Monfar *et al*, manuscript in preparation), and the titers were calculated as viral genomes per milliliter (vg/ml). Titers for rAAVGFP vector in IU/ml were measured in QBI-HEK 293A cells (Q-Biogene, Carlsbad, CA, USA) by counting transduction events 72h after vector exposure.

Animals and surgery. Female ICR mice (8-12 weeks old) were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (10mg/kg of body weight; Imalgene 500, Rhône-Merieux, Lyon, France) and xylazine (1mg/kg of body weight; Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany). After sciatic nerve exposure, local anesthesia with Bupivacaine 0.5% (B.Braun, Melsungen, Germany) was applied. Three- μ l of viral vectors were directly injected into the sciatic nerve through a 33-gauge needle and a Hamilton syringe connected to a Micropump (Micro4, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) at a rate of 400 nl/min. The injection site was approximately 45 mm from the tip of the third toe. The needle remained in place at the injection site for 1 additional min. before it was slowly removed. For nerve injury, the sciatic nerve was exposed at the mid thigh and crushed using fine forceps during 30 sec for 3 times, at a distance of 42 mm from the tip of the third toe.⁴⁹ Three μ l of viruses were loaded into the endoneurium just distal to the crush site. All mice were fed *ad libitum* with a standard diet (Teklad Global, Harlan Teklad,

Madison, WI, USA). Animal care and experimental procedures were approved by the Biosafety and the Ethical Committees of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Functional tests. Reinnervation of target organs was tested at 17, 24 and 30 days after nerve crush, by nerve conduction tests.^{35,36} Under anesthesia the sciatic nerve was stimulated at the sciatic notch and the compound muscle action potentials (CMAPs) were recorded from anterior tibialis and plantar muscles. The latency, indicative of conduction velocity, and the amplitude, indicative of amount of regeneration, of the CMAP were measured. Recovery of pain sensitivity was tested by light pricking with a needle in five areas, from the proximal pawpad to the tip of the second digit. A score to pinprick (PP) was assigned from no response (0), reduced or inconsistent response (1) to normal reaction (2) in each area tested, and summed to assess the extension of sensory reinnervation.^{35,36}

Neutralizing antibody titers against AAV in mouse serums. Serum from 3-wks-injected mice with each AAV pseudotype was serially diluted with serum from non-injected animals and incubated for 30 minutes at 37°C with an MOI of 1 (AAV1 2.9×10^6 vg; AAV2 2.24×10^6 vg; AAV8 1.54×10^8 vg or 3.07×10^7 vg for AAV8 1/5 low dose). Vector transgene expression was quantified after 72h incubation with QBI-HEK 293A cells.

Immunostaining. Anesthetized animals were perfused with phosphate-buffered saline (PBS), followed by 4% paraformaldehyde in PBS. Cryo-protected sciatic nerves and DRG were embedded in Tissue-Tek Oct Compound (Miles, Elkhart, IN, USA). Ten-mm thick sections of sciatic nerves were incubated with primary antibody dilutions at 1:1000 for S100 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), 1:500 for PGP 9.5 (UltraClone Ltd, Isle of Wight, UK) and 1:100 for CNTF (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA). Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 was used as secondary antibody (1:500; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Nuclear staining was obtained with TO-PRO-3 (1:100; Molecular Probes). Fluorescence was detected with a laser-scanning confocal microscope (TCs SP2; Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Germany).

RT-PCR assay. The RT4-D6P2T cells or sciatic nerves were homogenized with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or Qiazol (Qiagen, Hilden, Germany) respectively to obtain total RNA. Messenger RNA was retrotranscribed to cDNA (Omniscript RT Kit, Qiagen, Hilden, Germany) and analysis of expression was performed by Real Time PCR (Smart Cycler II; Cepheid Sunnyvale, CA, USA) with FastStart Sybrgreen Master (Roche Diagnostics). Primer sequences used: r36B4Fwd718: ATGGATACAAAAGGGTCCTGGC; r36B4Rv830: AGCCGCAAATGCAGATGGATC; m36B4Fwd718: ATGGGTACAAGCGCGTCCTG;

m36B4Rv830: AGCCCGCAAATGCAGATGGATC; mCNTF-Fwd: GACCTGACTGCTCTTATGGAATC; mCNTF-Rv: GCCTCAGTCATCTCACTCCAG; mGAP-43Fwd: AGCCTAAACAAGCCGATGTGCC; mGAP-43Rv: TTCGTCTACAGCGTCTTTCTCCTCC; GFP-Fwd: TGCTTCAGCCGCTACCCCGAC; GFP-Rv: TGTCGCCCTCGAACTTCACCTC.

PCR amplifications were performed as follows: heat inactivation (5 min, 95°C); followed by 45 cycles of 95°C, 15 s; 58°C, 30 s; 72°C, 30s. Fluorescence detection of product was performed at the end of the PCR extension and melting curves were analyzed by monitoring the continuous decrease in fluorescence of the SYBR Green signal. PCR products were verified for a single amplification product using melting curve analysis and the molecular weight of each product was confirmed by agarose electrophoresis. Quantification relative to 36B4 controls was calculated using the Pfaffl method.³⁷

DNA was extracted from sciatic nerve and DRG with 0.1 mg/ml of proteinase K (Roche Diagnostics), followed by phenol/chloroform extraction. RT primers for cyclophilin B, as housekeeping gene, or GFP were as follows: mCyclophilinB-Fwd6009: TCAACCTCTCCTCTCCTGCC; mCyclophilinB-Rv6141: GGTTTCTCCACTTCGATCTTGC; CMVA AV2-Fwd: AGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC; GFPAAV2-Rv: TGCTCACCATGGTGGCGACC. Viral genome copies/cell were calculated using a standard curve generated from known amounts of a plasmid DNA containing a CMV-GFP sequence or a 500 pb cyclophilin PCR product (CyclophilinB-Fwd5617: CATGCCTATGGTCCTAGCTT and CyclophilinB-Rv6141) purified by GeneClean (Q-Biogene, Carlsbad, CA, USA) in 10 ng/ μ l salmon's sperm DNA (Sigma) and assuming that 1 μ g of mouse genomic DNA contains 3×10^5 haploid genomes.

Statistics. Students *t* test or two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc tests were performed for each set of data.

ACKNOWLEDGMENTS

We are in debt with M. Monfar and M.M. Segura for critically reading this manuscript. We thank the vector core of the University Hospital of Nantes and the Vector Production Unit at CBATEG (Universitat Autònoma de Barcelona) that were supported by the *Association Française contre les Myopathies* (AFM) for producing AAV vectors. JH and LA were recipients of predoctoral fellowships from the AFM (AFM2008/13622AE) and the Generalitat de Catalunya (2006FI00762) respectively. AB was a recipient of the Ramon y Cajal Program. This

work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI051705 and PS09730 to AB, PI061555 to MC, PI080598 to EU, and RETICS TERCEL to XN), the Generalitat de Catalunya (SGR 2009-1300) and the UAB (EME04-07).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest on the subject.

REFERENCES

1. Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N, Peles E. Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci* 2004; 24: 9250-9260.
2. Srinivasan R, Fink DJ, Glorioso JC. HSV vectors for gene therapy of chronic pain. *Curr Opin Mol Ther* 2008; 10: 449-455.
3. Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol* 2004; 164: 111-122.
4. Hollis ER, 2nd, Kadoya K, Hirsch M, Samulski RJ, Tuszynski MH. Efficient retrograde neuronal transduction utilizing self-complementary AAV1. *Mol Ther* 2008; 16: 296-301.
5. Storek B, Reinhardt M, Wang C, Janssen WG, Harder NM, Banck MS *et al.* Sensory neuron targeting by self-complementary AAV8 via lumbar puncture for chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 1055-1060.
6. Towne C, Pertin M, Beggah AT, Aebischer P, Decosterd I. Recombinant adeno-associated virus serotype 6 (rAAV2/6)-mediated gene transfer to nociceptive neurons through different routes of delivery. *Mol Pain* 2009; 5: 52.
7. Glatzel M, Flechsig E, Navarro B, Klein MA, Paterna JC, Bueler H *et al.* Adenoviral and adeno-associated viral transfer of genes to the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 442-447.
8. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-267.
9. Desmaris N, Bosch A, Salaun C, Petit C, Prevost MC, Tordo N *et al.* Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. *Mol Ther* 2001; 4: 149-156.
10. Watson DJ, Kobinger GP, Passini MA, Wilson JM, Wolfe JH. Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. *Mol Ther* 2002; 5: 528-537.
11. Hendriks WT, Eggers R, Verhaagen J, Boer GJ. Gene transfer to the spinal cord neural scar with lentiviral vectors: predominant transgene expression in astrocytes but not in meningeal cells. *J Neurosci Res* 2007; 85: 3041-3052.
12. Hu Y, Leaver SG, Plant GW, Hendriks WT, Niclou SP, Verhaagen J *et al.* Lentiviral-mediated transfer of CNTF to schwann cells within reconstructed peripheral nerve grafts enhances adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Mol Ther* 2005; 11: 906-915.
13. Tannemaat MR, Eggers R, Hendriks WT, de Ruiter GC, van Heerikhuizen JJ, Pool CW *et al.* Differential effects of lentiviral vector-mediated overexpression of nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor on regenerating sensory and motor axons in the transected peripheral nerve. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 1467-1479.
14. Eggers R, Hendriks WT, Tannemaat MR, van Heerikhuizen JJ, Pool CW, Carlstedt TP *et al.* Neuroregenerative effects of lentiviral vector-mediated GDNF expression in reimplanted ventral roots. *Mol Cell Neurosci* 2008; 39: 105-117.
15. Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, Henderson KM, Henning PP. AAV8, 9, Rh10, Rh43 Vector Gene Transfer in the Rat Brain: Effects of Serotype, Promoter and Purification Method. *Mol Ther* 2008; 16: 89-96.

16. Xu Y, Gu Y, Wu P, Li GW, Huang LY. Efficiencies of transgene expression in nociceptive neurons through different routes of delivery of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 897-906.
17. Jooss K, Yang Y, Fisher KJ, Wilson JM. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* 1998; 72: 4212-4223.
18. Vandenberghe LH, Wang L, Somanathan S, Zhi Y, Figueredo J, Calcedo R *et al.* Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. *Nat Med* 2006; 12: 967-971.
19. Lowenstein PR, Mandel RJ, Xiong WD, Kroeger K, Castro MG. Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of brain diseases: the role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions. *Curr Gene Ther* 2007; 7: 347-360.
20. Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE *et al.* Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 2003; 33: 366-374.
21. Malik RA, Tesfaye S, Newrick PG, Walker D, Rajbhandari SM, Siddique I *et al.* Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy. *Diabetologia* 2005; 48: 578-585.
22. Engelstad JK, Davies JL, Giannini C, O'Brien PC, Dyck PJ. No evidence for axonal atrophy in human diabetic polyneuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 255-262.
23. Tebar LA, Geranton SM, Parsons-Perez C, Fisher AS, Bayne R, Smith AJ *et al.* Deletion of the mouse RegIIIbeta (Reg2) gene disrupts ciliary neurotrophic factor signaling and delays myelination of mouse cranial motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 11400-11405.
24. Talbott JF, Cao Q, Bertram J, Nkansah M, Benton RL, Lavik E *et al.* CNTF promotes the survival and differentiation of adult spinal cord-derived oligodendrocyte precursor cells in vitro but fails to promote remyelination in vivo. *Exp Neurol* 2007; 204: 485-489.
25. Stockli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Gotz R *et al.* Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 1989; 342: 920-923.
26. MacLaren RE, Buch PK, Smith AJ, Balaggan KS, MacNeil A, Taylor JS *et al.* CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retinae undergoing focal injury and branch vessel occlusion. *Exp Eye Res* 2006; 83: 1118-1127.
27. Seniuk NA, Henderson JT, Tatton WG, Roder JC. Increased CNTF gene expression in process-bearing astrocytes following injury is augmented by R(-)-deprenyl. *J Neurosci Res* 1994; 37: 278-286.
28. Buch PK, MacLaren RE, Duran Y, Balaggan KS, MacNeil A, Schlichtenbrede FC *et al.* In contrast to AAV-mediated Cntf expression, AAV-mediated Gdnf expression enhances gene replacement therapy in rodent models of retinal degeneration. *Mol Ther* 2006; 14: 700-709.
29. Navarro X. Chapter 27: Neural plasticity after nerve injury and regeneration. *Int Rev Neurobiol* 2009; 87: 483-505.
30. Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 2006; 9: 408-419.
31. Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 1990; 345: 440-441.
32. Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, Weitzman MD, Hope TJ. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2295-2305.
33. Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K *et al.* Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 1999; 6: 973-985.
34. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 1998; 72: 2224-2232.
35. Navarro X, Verdu E, Buti M. Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Exp Neurol* 1994; 129: 217-224.
36. Udina E, Ceballos D, Gold BG, Navarro X. FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers. *Exp Neurol* 2003; 183: 220-231.
37. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45.

Table 1. Electrophysiological tests for animals injected with AAV8-GFP or AAV-CNTF intrasciatically

Target / Parameter	17 dpi		24 dpi		30 dpi	
	+GFP	+CNTF	+GFP	+CNTF	+GFP	+CNTF
<i>Ant tibialis muscle</i>						
Latency (ms)	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.6	2.6 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.2
CMAP (mV)	3.8 ± 1.9	4.3 ± 1.6	7.6 ± 1.7	12.4 ± 1.6	14.7 ± 1.3	20.5 ± 1.7 *
<i>Plantar muscle</i>						
Latency (ms)	11.2 ± 1.0	11.3 ± 0.9	5.3 ± 0.6	5.0 ± 0.4	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.2
CMAP (mV)	0.06 ± 0.06	0.07 ± 0.05	0.56 ± 0.17	0.89 ± 0.37	1.3 ± 0.4	1.9 ± 0.5
<i>Nociception</i>						
Pinprick score	0.5 ± 0.5	0.7 ± 0.5	2.2 ± 0.3	2.5 ± 0.5	4.5 ± 1.5	5.5 ± 0.5

Abbreviations: dpi, days after injury; Ant, anterior; CMAP, compound muscle action potential; ms, milliseconds; mV, millivolts.

Data are expressed as mean ± SEM.

n=4/group.

* $p < 0.05$ vs +GFP

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: Dorsal root ganglia targeted via intrasciatic administration. Immunofluorescence of sections of dorsal root ganglia from mice injected intrasciatically with AAV2/1, AAV2/2 or AAV2/8 showing GFP expression in scattered neurons. Neurons were stained with PGP 9.5. Arrows show GFP-positive neurons and arrowheads indicate GFP-positive Schwann cells. Insets show a 3x magnification of the framed GFP positive cells. In the lower right panel there is a quantification of the % of GFP-positive neurons per section (counts at least from 8 sections from 3 ganglia for each virus; bars represent means ± SEM). Statistical analysis: students *t* test with $p < 0.01$ comparing AAV8 and AAV2 (§); $p < 0.001$ between AAV8 and AAV1 (#). Scale bar, 130 μm.

Fig. 2. Sciatic transduction using AAV vectors. Confocal microscopy images showing immunofluorescence in sections of mouse sciatic nerves transduced with AAV2/1, AAV2/2 or AAV2/8 coding for GFP (in green) under the control of the CMV promoter. PGP 9.5 was used as

neuronal marker and S100 as Schwann cell marker (both in red; Marker). Merged images show co-localization of the 3 serotypes tested with Schwann cells or PNS neurons. Scale bar, 42 μm in first column; 21 μm in last column.

Fig. 3: Long-term expression in sciatic nerves. **A.** β -Galactosidase activity/ μg protein in sciatic nerves transduced with AAV1 and AAV8CMVnlsLacZ was evaluated at 1, 3, 6 and 10 weeks after transduction (n=4 for each time point and virus; bars show means \pm SEM). **B.** Quantitative PCR of vector DNA present in the sciatic nerve at 1, 6 and 10 weeks after intrasciatic administration. Horizontal bars represent the mean values obtained from all samples for each time-point and virus (n=4; dots). Results are significantly different with $p < 0.05$ by two-way ANOVA with Bonferroni posthoc tests.

Fig. 4. Neutralizing antibody titers against AAV serotypes. Serum collected at 3 weeks from mice injected with AAV1 (\blacklozenge ; n = 4), AAV2 (\square ; n=4), AAV8 (\blacktriangle ; n=4) or AAV8 at 1/5 lower dose (\triangle ; n=2) was serially diluted and incubated with each corresponding AAV serotype expressing GFP in QBI-HEK 293A cells. Green fluorescent cells (gfu) were counted at 48h and results normalized by the number of gfu of each viral serotype incubated with serum from non-injected mice. Plotted graphs show means \pm SEM for each virus and serum dilution. Significant differences were detected by two-way ANOVA with Bonferroni posthoc tests between the three serotypes tested ($p < 0.05$).

Fig. 5. Long-term expression of AAV8 in injured sciatic nerves. Quantification of β -galactosidase expression in injured sciatic nerves injected with AAV1 (\blacklozenge) and AAV8 (\triangle) by galactolight assay at 1, 3, 6 and 10 weeks post-administration (n=4/group and time point). Results (means \pm SEM) were normalized by the % of protein activity relative to the peak of expression. Students *t* test comparing AAV1 and AAV8-driven expression for each time-point showed statistically significant differences (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Fig. 6. AAV8CNTF increases nerve regeneration and myelin proteins expression. AAV8CNTF or AAV8GFP were administered into the sciatic nerve of mice that had undergone nerve crush. Four weeks later, the animals were analyzed. **A.** CNTF immunohistochemistry in sections of the proximal nerve crush area. Confocal microscopy detected increased CNTF staining in Schwann cell-like morphology in injured sciatic nerves injected with AAV8-CNTF

compared to control animals injected with AAV8-GFP. Images were obtained under identical scanning conditions. S100 immunohistochemistry was performed to confirm Schwann cell-specific CNTF staining (data not shown). Scale bar: 65 μm . **B.** Real Time PCR was performed to quantify CNTF, P0 and PMP22 expression in sciatic nerves or GAP43 in DRG of the GFP- or CNTF-treated animals. Differences between the two groups were statistically significant for the tested mRNAs ($p < 0.05$, Students *t* test; $n = 3$ animals/group; 2 different experiments).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Fig. S1. AAV8 efficiency depending on the method of purification.

AAV8-driven expression of GFP was quantified by real time PCR in sciatic nerves and DRG, 3 wks after intrasciatic administration of 8×10^6 gfu of AAV8CMV-GFP purified by iodixanol or CsCl gradients ($n = 3$ for each condition).

Fig. S2. No CTL response was detected in AAV injected sciatic nerves 1 week postadministration.

Hematoxylin and eosin staining of fresh-frozen sciatic nerve sections, one week after 1.8×10^9 vg of different pseudotypes of AAV-GFP administration. **A.** AAV1, **B.** AAV2 and **C.** AAV8. No cellular infiltration is detected in the injected nerves. Scale bar, 65 μm .

Fig. S3. Lymph node histology

Hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded lymph node sections representative from mice injected with different AAV-GFP pseudotypes. **A.** Non-injected mouse. **B., C.** and **D.** AAV1-, AAV2- and AAV8-injected, respectively. Scale bar, 165 μm . No secondary lymph follicles were observed in AAV-injected mice ($n = 3$).

Fig. S4. Overexpression of CNTF in Schwann cells upregulates myelin protein expression.

A. RT4-DP6 rat Schwann cell line was transfected with CAG-CNTF or CAG-GFP plasmids and myelin proteins were quantified by reverse transcriptase PCR 48h later. Overexpression of CNTF correlates with significant increase in P0 and PMP22 expression ($p < 0.05$, Students *t* test). This figure shows the results obtained with undifferentiated RT4-DP6 cell line, but very similar data was obtained in differentiated and non-differentiated RT4-DP6 and S16 cell lines (data not

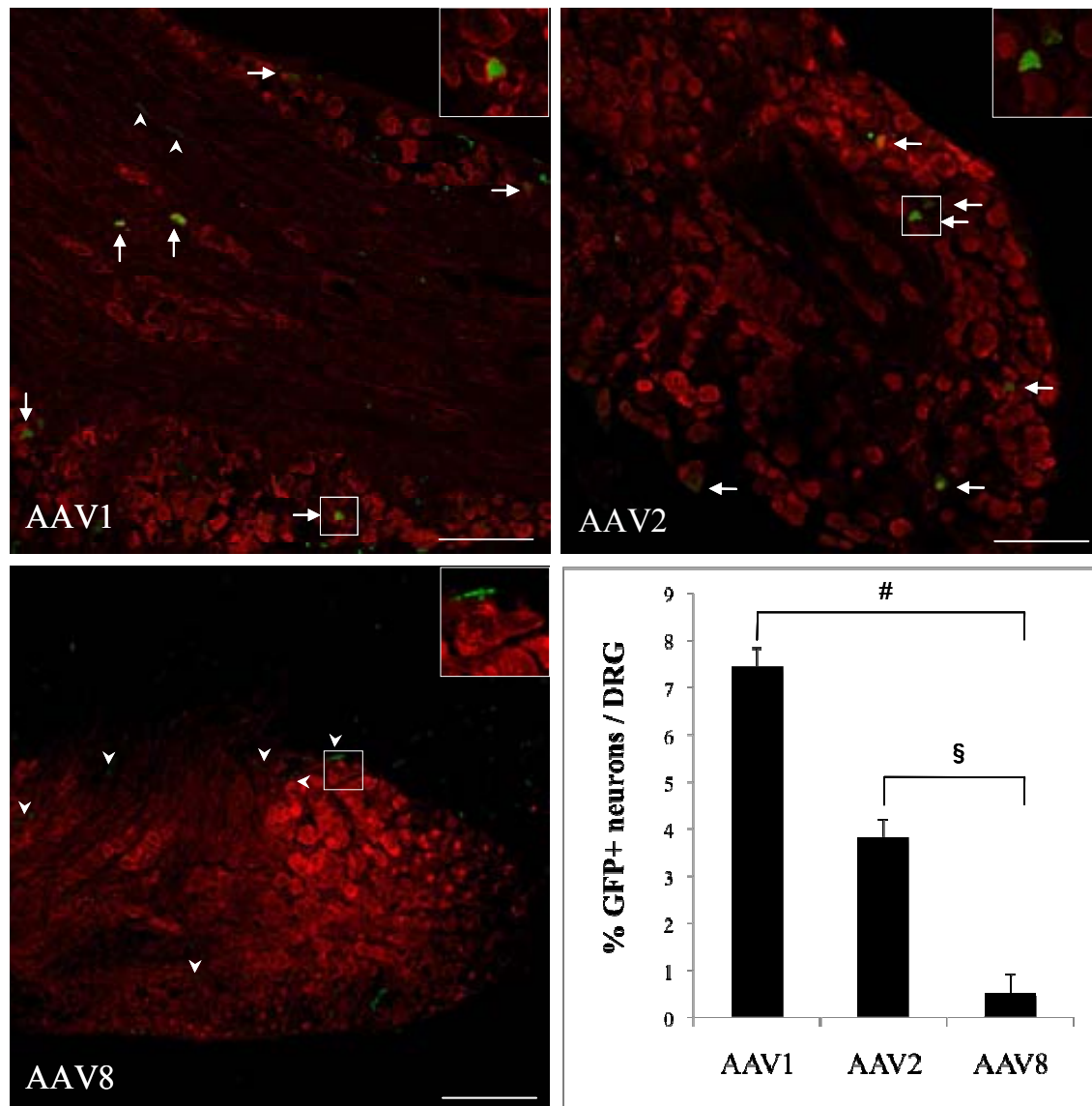
shown). Both cell lines express levels of P0 and PMP22 myelin proteins similar to sciatic adult nerve but lower levels of MAG.¹

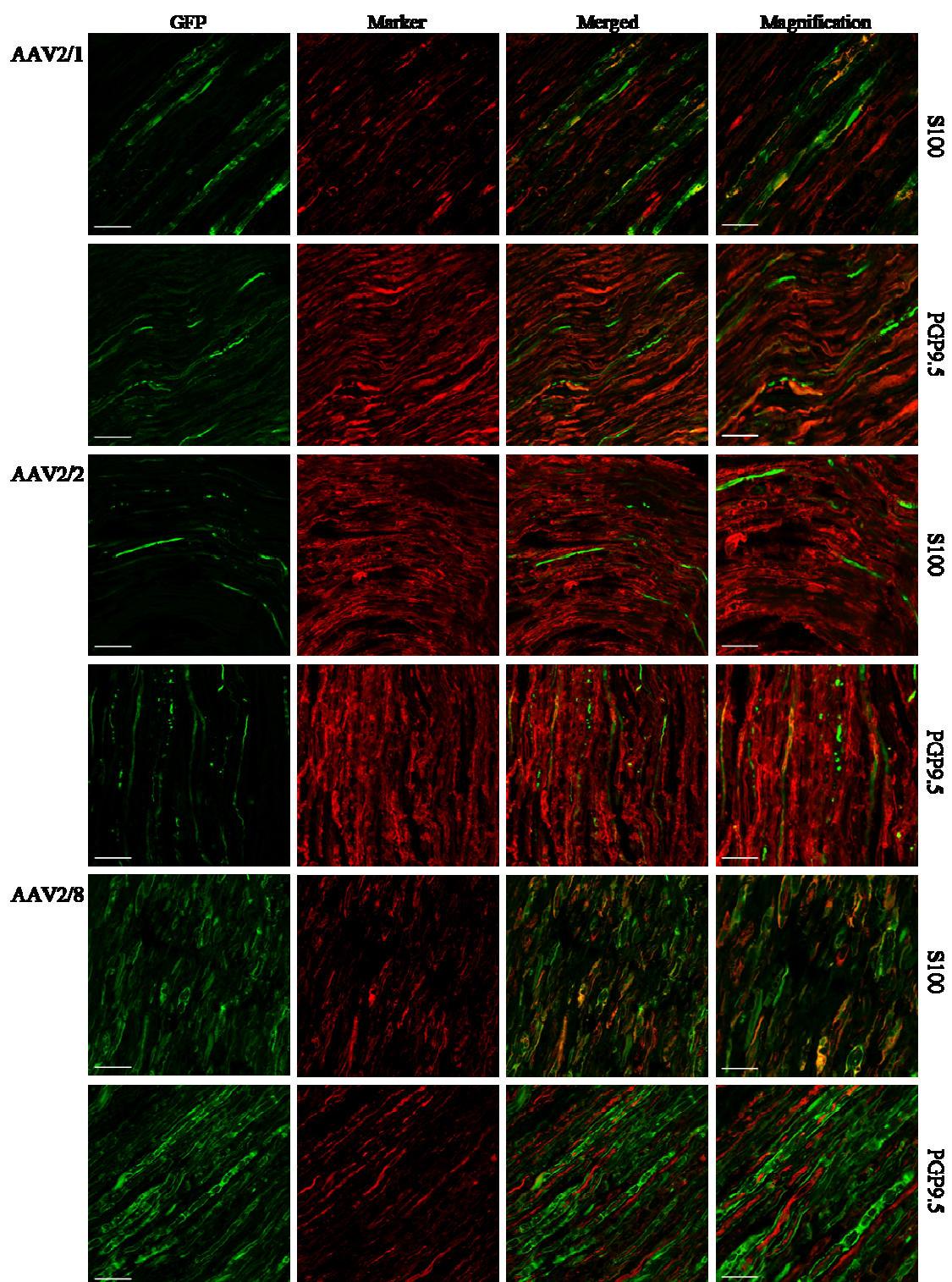
SUPPLEMENTAL METHODS

Cell Culture. The RT4-D6P2T is a clone derived from the rat Schwannoma RT4-D6 cell line (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA) and S16 is an immortalized rat Schwann cell line kindly donated by R Quarles (NIH, USA).² Cultures were maintained in DMEM with L-Glutamine supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS-Gold), 1% penicillin and 1% streptomycin (all media from PAA, Pasching, Austria) at 37°C and 5% CO₂.

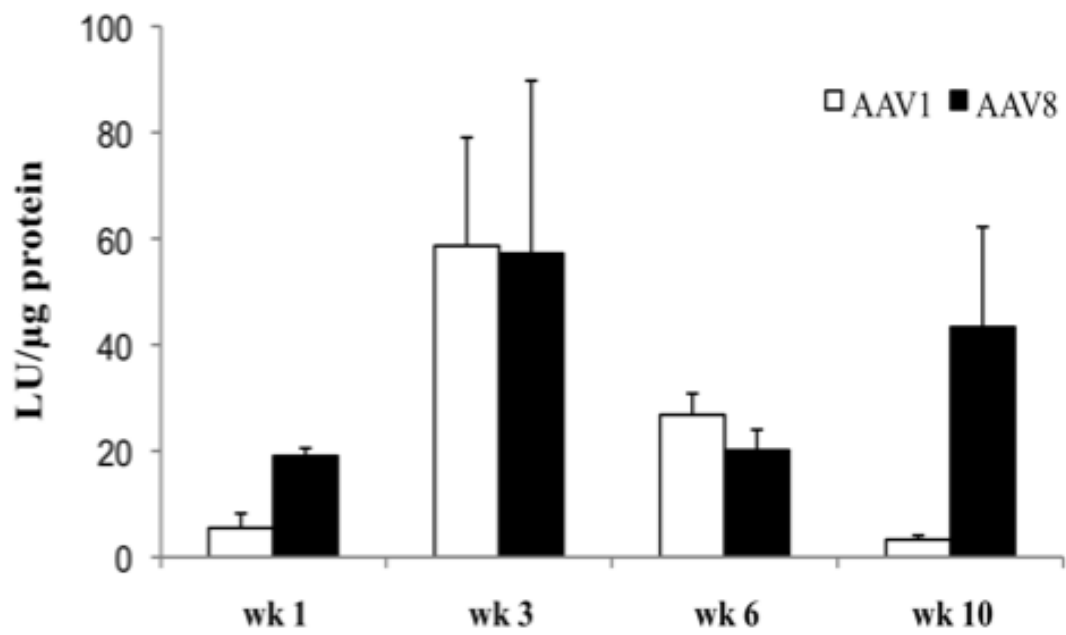
SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Hai M, Muja N, DeVries GH, Quarles RH, Patel PI. Comparative analysis of Schwann cell lines as model systems for myelin gene transcription studies. *J Neurosci Res* 2002; 69: 497-508.
2. Sasagasako N, Toda K, Hollis M, Quarles RH. Myelin gene expression in immortalized Schwann cells: relationship to cell density and proliferation. *J Neurochem* 1996; 66: 1432-1439.

**Fig. 1**



A



B

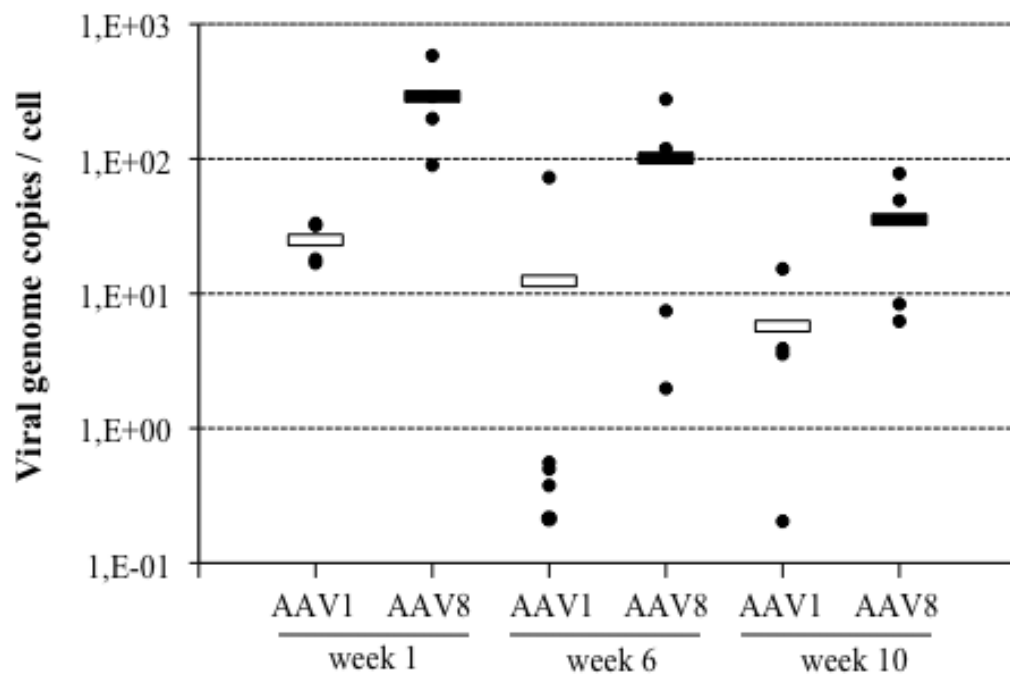


Figure 3

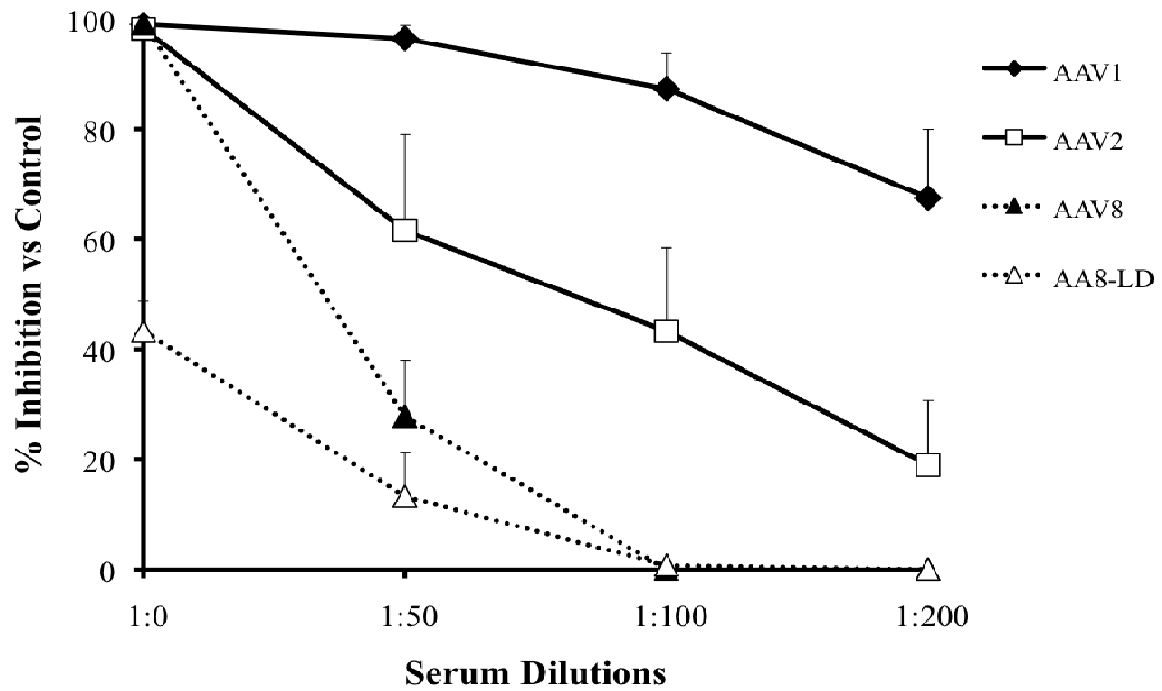


Figure 4

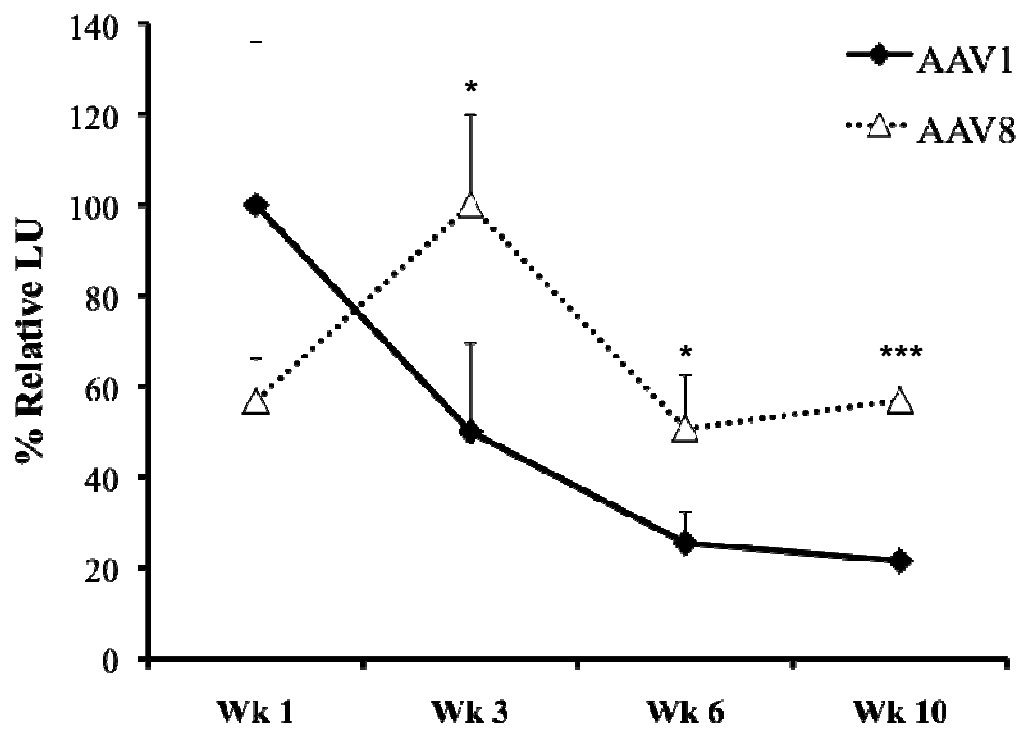
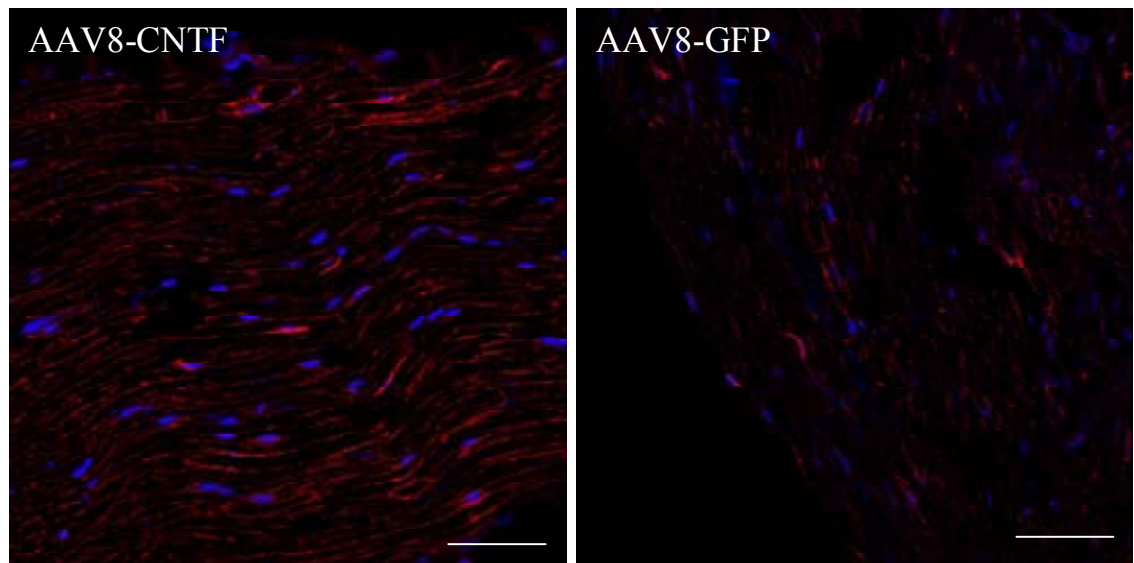


Figure 5

A



B

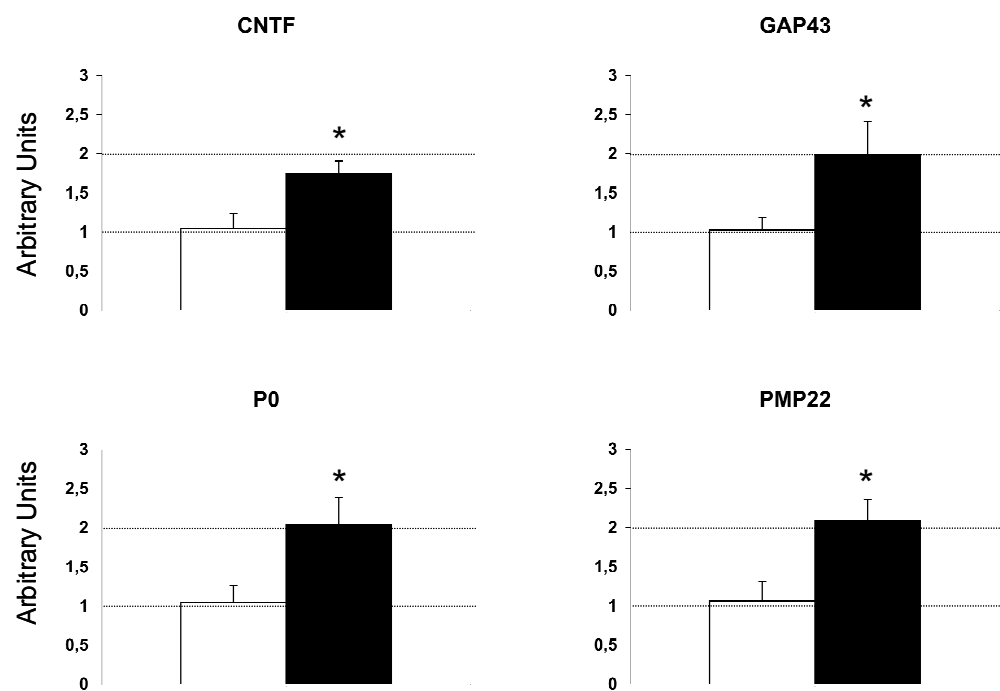
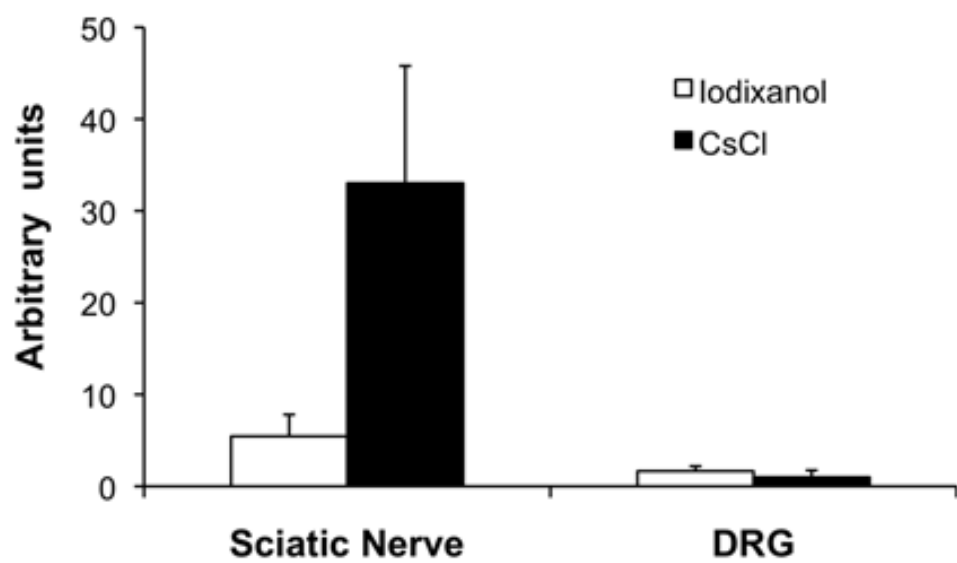
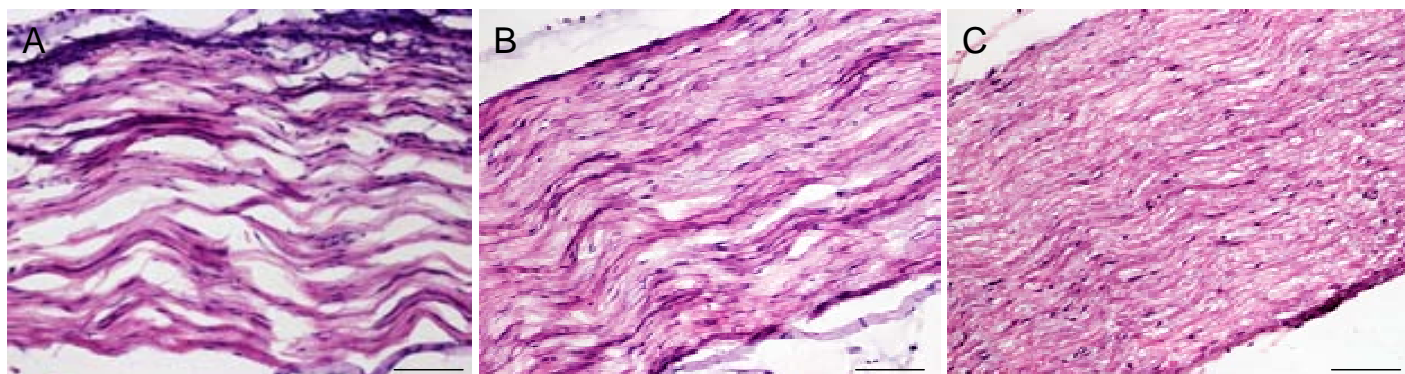


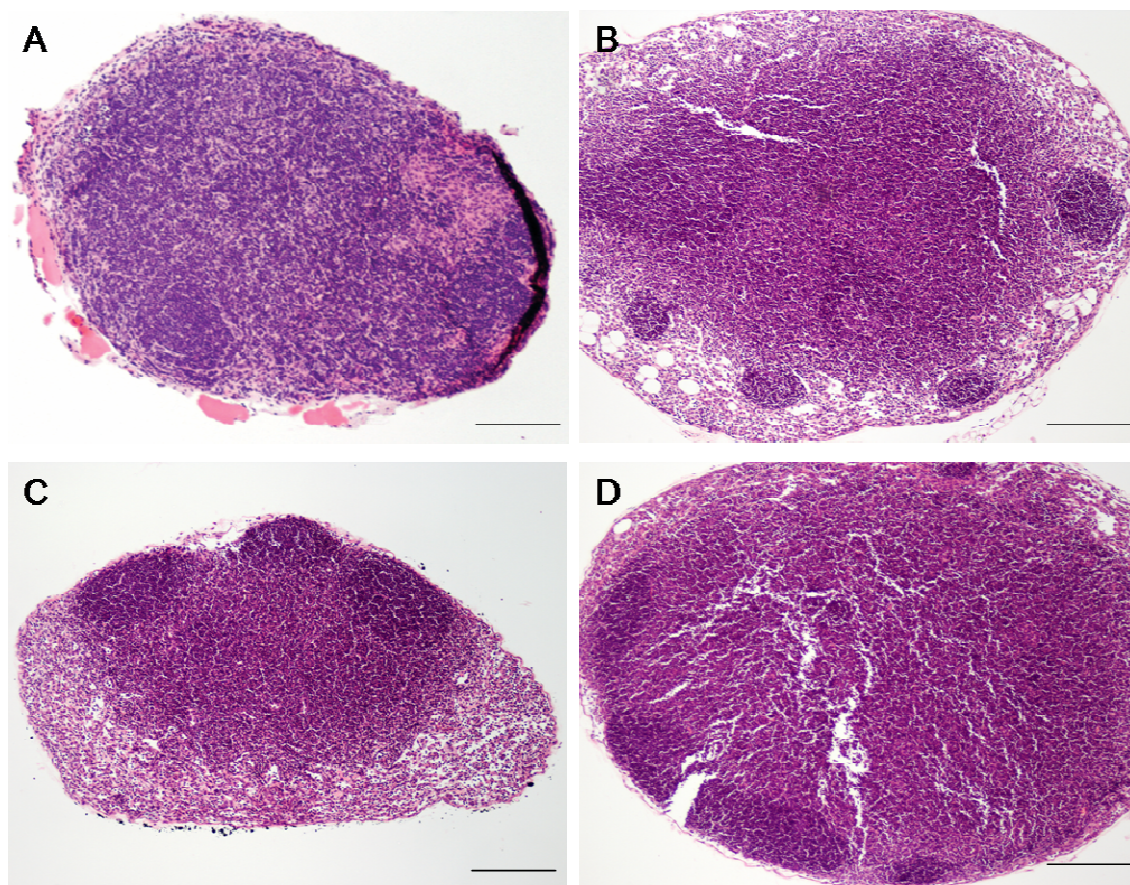
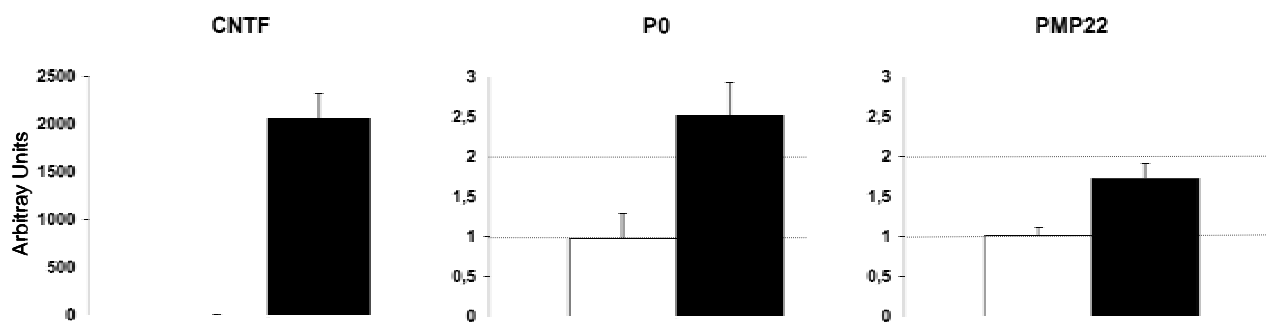
Fig. 6



Supplementary Fig. S1



Supplementary Fig. S2

**Supplementary Fig. S3****Supplementary Fig. S4**

Sotmès a *Experimental Neurology*

COMPARATIVE STUDY OF PERIPHERAL NEUROPATHY AND NERVE REGENERATION IN NOD AND ICR DIABETIC MICE

J. Homs¹, L. Ariza¹, E. Verdú^{2,3}, L. Casals^{2,3}, M. Chillón^{1,4}, A. Bosch¹ & X. Navarro^{2,3}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology and Centre de Biotecnologia i Teràpia Gènica (CBATEG), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

²Department of Cell Biology, Physiology and Immunology and Institute of Neurosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

³CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, Spain

⁴Institut Català per la Recerca i d'Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to Dr. Assumpció Bosch at

CBATEG

Edifici H

Universitat Autònoma de Barcelona

08193 Bellaterra

Barcelona

Spain

Phone: 34 93 581 4203

Fax: 34 93 581 4200

Email: assumpcio.bosch@uab.es

ABSTRACT

Aims/hypothesis: The NOD mouse has been suggested as an adequate model for the study of diabetic autonomic neuropathy.

Methods: We evaluated sensorymotor neuropathy in NOD male mice rendered diabetic by multiple low doses of streptozotocin, in comparison with similarly treated ICR mice. Nerve regeneration was also evaluated following sciatic nerve crush.

Results: Neurophysiological values for the intact hindlimb were similar in NOD and ICR control groups during follow-up. Both strains of diabetic mice showed a decline in motor and sensory NCV at 47 and 54 days after induction of diabetes. However, the amplitudes of compound muscle and sensory action potentials (CMAPs and CNAPs) were significantly reduced in NOD diabetic mice but not in ICR mice. Morphometrical analyses showed a loss of myelinated fibers in NOD mice with high levels of glycemia, but no significant changes in fiber size. There was a reduction of intraepidermal nerve fibers in the diabetic mice, more pronounced in NOD than in ICR mice. Interestingly, aldose reductase and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity were increased already at 1 week of hyperglycemia and persisted till the end of the experiment in

both diabetic mouse strains. Following sciatic nerve crush, muscle and nerve reinnervation was delayed in diabetic mice. The amplitudes of CMAPs and CNAPs at 24 days postcrush were significantly smaller in diabetic mice than in control groups.

Conclusions/Interpretation: Diabetes of mid duration in mice induces more severe peripheral neuropathy and slower regeneration in NOD than in ICR mice.

Key words: diabetic neuropathy, non-obese diabetic mice, nerve conduction, nerve regeneration, aldose reductase activity, PARP activity

Abbreviations: AR: Aldose reductase
CMAP: compound muscle action potential
CNAP: sensory compound nerve action potential
NCV: nerve conduction velocity
PARP: poly(ADP-ribose) polymerase
STZ: streptozotocin
IENF: intraepidermal nerve fibers

INTRODUCTION

Peripheral polyneuropathy, involving somatic sensory and motor nerves as well as autonomic nerves, is the most common and more disabling long-term complication of diabetes mellitus. Axonal degeneration, nerve fiber loss, segmental demyelination and remyelination are characteristic pathological features of human diabetic polyneuropathy. (Dyck and Giannini, 1999) Experimental animal models have provided useful information with regard to the neuropathic complications of diabetes. They develop metabolic abnormalities in the peripheral nerves, as well as subsequent functional deficits such as slowed nerve conduction velocity and impaired axonal transport (Yagihashi, 1995). However, variable and sometimes conflicting results have been reported from morphological and morphometrical studies of peripheral nerves in experimental diabetic animals. (Sima and Sugimoto, 1999) In particular, the parallel effects of aging, growth retardation and uremia have been controversial, as well as the differential effects of diabetes on axon and myelin abnormalities (Dockery and Sharma, 1990, Sharma and PK, 1987, Wright and Nukada, 1994). Unfortunately none of the animal models of diabetes adequately reproduce the pattern and severity of human diabetic neuropathy, with changes in animal nerves usually being limited to relatively mild neurophysiological deficits and minor morphometric changes without significant morphological abnormalities (Hounsom and Tomlinson, 1997, Sharma and PK, 1987, Wright and Nukada, 1994). This situation limits the usefulness of experimental studies.

Recently, two mouse models for type 2 diabetes have been characterized as appropriate working models for diabetic neuropathy: the db/db mutation in C57BKS background (Sullivan, et al., 2007) and the ob/ob mouse in a similar background (Drel, et al., 2006). On the other hand, the non-obese diabetic (NOD) mouse has been described as an adequate model for type 1 diabetic autonomic neuropathy, since it develops severe sympathetic ganglionic neuropathology, more rapid and severe than other rodent models (Schmidt, et al., 2003). However, the only peripheral neuropathic feature reported in the NOD mouse model was abnormal pain sensitivity to hot stimulation (Gabra and Sirois, 2005, Obrosova, et al., 2005).

Among the factors implicated in the pathogenesis of diabetic complications, acceleration of the polyol pathway, an alternate route of glucose metabolism, was the first mechanism suggested to play a key role in the early tissue damage (Gabbay, et al., 1966). The polyol pathway is composed of two enzymes, aldose reductase (AR) that converts glucose to sorbitol using NADPH as a cofactor, and sorbitol dehydrogenase, which converts sorbitol to fructose using NAD⁺ as a cofactor. On the other hand, NADPH is also the essential cofactor for reducing glutathione, a critical intracellular antioxidant. If NADPH is not available in Schwann cells, the amount of reduced glutathione decreases, so the polyol pathway increases susceptibility to intracellular oxidative stress, which may be the unified mechanism in the pathogenesis of most diabetic complications (for review see (Brownlee, 2005, Like and Rossini, 1976)). Free radicals, oxidants, and perhaps some still-unidentified metabolic factors result in activation of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), a recently discovered fundamental mechanism in the pathogenesis of diabetes complications including endothelial dysfunction, cardiomyopathy, retinopathy and neuropathy (Garcia Soriano, et al., 2001, Obrosova, et al., 2004, Pacher, et al., 2002). Counteracting nitrosative stress, the product of superoxide anion radical with nitric oxide, in early diabetic neuropathy in NOD mice improved pain sensitivity (Obrosova, et al., 2005).

The main aim of this study was to compare, by means of biochemical, electrophysiological and morphological evaluations, the neuropathic profile of mid-term diabetes (8 weeks) induced by multiple low doses of streptozotocin (STZ) in ICR and NOD mice. We also identified some biochemical markers of diabetic neuropathy as early as 1 week of diabetes. In addition, the impact of STZ-induced diabetes on the regenerative potential of peripheral nerves was evaluated in the same strains of mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male ICR and NOD mice, 8–10 weeks old, were used. Mice were fed ad libitum with a standard diet (2018S Teklad Global, Harlan Laboratories; 17% calories from fat) and kept under a light–dark cycle of 12 hr (lights on at 8:00 am). To induce insulin-dependent diabetes, mice were given, on 5 consecutive days, an intraperitoneal injection of STZ (45 mg/kg body weight for ICR or 35 mg/kg body weight for NOD mice) dissolved in 0.1 mol/l citrate buffer (pH 4.5) immediately before administration. Diabetes was assessed by measuring blood glucose levels with a Glucometer Elite (Bayer, Leverkusen, Germany). Animal care and experimental procedures were approved by the Biosafety and the Animal and Human Experimentation Ethical Committees of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Animals were divided into the following groups: Untreated control ICR mice, (ICR-c, n=10); STZ-induced diabetic ICR mice (ICR-d, n=15); control NOD mice (NOD-c, n=13); STZ-induced diabetic NOD mice showing intermediate blood glucose levels (between 300 and 400 mg/dl) during follow-up (NOD-dm, n=8); and STZ-induced diabetic NOD mice showing high hyperglycemia (above 500 mg/dl of blood glucose) during follow-up (NOD-dh, n=12).

In each group, the left sciatic nerve was intact and served to assess the impact of hyperglycemia on nerve function, whereas the right sciatic nerve was subjected to a focal crush lesion and was used to evaluate differences in the regenerative capacity between experimental groups.

Surgical procedures

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (10mg/kg; Imalgene 500, Rhône-Merieux, Lyon, France) and xylazine (1mg/kg; Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany). After sciatic nerve exposure at the mid-thigh, local anesthesia with bupivacaine 0.5% (B.Braun, Melsungen, Germany) was applied and the nerve was injured by crush during 30 seconds for three times in succession with a Dumont No. 5 forceps at a constant point, 42 mm from the tip of the third digit. The wound was then sutured by layers. The left sciatic nerve was left intact.

Aldose reductase activity

Aldose reductase activity was spectrophotometrically measured following the decrease of NADPH during the reduction of glyceraldehyde (both from Sigma, Saint Louis, MO, USA), as published (Sato, S. 1992). Briefly, the reaction was started by adding 100 mM DL-

glyceraldehyde to 100 mg of sciatic nerve protein extract in 1M phosphate buffer containing 1.5 mM NADPH (total volume of 200 μ l). Following 5 min incubation NADPH was measured at 340 nm. One enzyme unit (U) was defined as nmols of oxidated NADPH /min and mg of protein.

Western blot analysis

Sciatic nerves and dorsal root ganglia (DRGs) were sonicated and homogenized in RIA lysis buffer (50mM Tris-Cl pH 7.4, 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% sodiumdeoxycholate and Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics, Basel, Germany)). Protein concentration was determined by BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA), and 50 μ g of proteins were separated on 10% SDS-PAGE gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PVDF membranes were incubated with anti-aldose reductase (AR) (1:500, kindly donated by T. G. Flynn, Queen's University, Ontario, Canada) or anti-poly(ADP-ribose) modified proteins (1:1000; Biomol Intl., Plymouth Meeting, PA, USA) and anti-rabbit or anti-mouse conjugated to HRP, respectively (1:2000, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) combined with western blotting detection reagent (ECL Plus; Amersham, Freiburg, Germany). The same membranes were stripped and incubated with anti-actin (1:500, Sigma, Saint Louis, MO, USA). Band pixel intensities were quantified by GeneSnap software for Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK) and normalized by anti-actin levels in each line.

Functional tests

Nerve conduction studies were performed bilaterally in the sciatic nerve (Navarro, et al., 1994, Verdu, et al., 1999) at two time points, 17 and 24 days following the surgical lesion. With animals under anesthesia (pentobarbital 40 mg/kg i.p.) the nerve was stimulated percutaneously through a pair of small needle electrodes placed first at the sciatic notch and then at the ankle. Rectangular electrical pulses (Grass S88) of 0.01 ms duration were applied up to 25% above the voltage that gave a maximal response. The compound muscle action potentials (CMAPs), elicited by orthodromic conduction (M wave) and by the monosynaptic reflex arc (H wave), were recorded from the third interosseus plantar muscle and from the tibialis anterior muscle with microneedle electrodes. Similarly, the sensory compound nerve action potential (CNAP) was recorded by electrodes placed at the fourth toe near the digital nerves. All evoked action potentials were displayed on a storage oscilloscope (Tektronix 420) at settings appropriate to measure the amplitude from baseline to peak and the latency to the onset of the CMAP and the

CNAP and to the peak of the H wave. The nerve conduction velocity (NCV) was calculated for each segment tested; motor NCV for the sciatic notch-ankle segment, sensory NCV for the proximal segment sciatic notch-ankle (SNCVp) and for the distal segment ankle-digit (SNCVd). During electrophysiological tests, the animals were placed over a warm flat steamer controlled by a hot water circulating pump, and the hindpaw skin temperature was maintained above 32°C.

Thermal nociceptive threshold was evaluated in the intact hindpaw by means of a plantar algesimeter (Ugo Basile, Comerio, Italy). Mice were placed into a plastic box with an elevated glass floor. The beam of a projection lamp was focused from the bottom of the box onto the plantar surface of the paw. (Hargreaves, et al., 1988) When the hindpaw was lifted, the light was shut off and the latency measured through a time-meter coupled with IR detectors. A cutoff time was set at 20 s to prevent tissue damage. In the injured hindlimb, recovery of pain sensibility was tested by light pricking with a needle at five areas, from the most proximal pad to the tip of the second digit on the plantar aspect of the hindpaw, under a dissecting microscope in order to assess progression of skin reinnervation. A score to pinprick (PP) was assigned from no response [0], reduced or inconsistent responses [1] to normal reaction [2] in each area tested. (Navarro, et al., 1994)

Histological methods

At the end of the experiment, four mice of each group were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde and the tibial nerve above the ankle and the plantar pads carefully removed under a dissecting microscope and processed by histological and immunohistochemical methods respectively.

The tibial nerve samples were fixed in glutaraldehyde-paraformaldehyde (3%:3%) in cacodylate buffer (0.1M, pH: 7.4) for 4-6 h at 4°C, then post-fixed with 2% osmium tetroxide, washed in distilled water, dehydrated in graded series of ethanol and embedded in epoxy resin. Light microscopy observations were performed on 0.5 µm semithin sections stained with toluidine blue, under an Olympus BX-40 microscope. A morphometrical evaluation, including nerve cross-sectional area, axonal counts, and myelinated axon and fiber perimeters and diameters, was made from images obtained using an Olympus DP50 camera connected to a computer and processed to a magnification of 200x (for measurement of the cross-sectional area of the entire nerve) and to 2600x (for myelinated fiber morphometry). Printed images of systematic randomly selected fields, covering at least 300 myelinated fibers, were used for morphometrical analyses with the help of a computer linked digitizing tablet and Image software. (Ceballos, et al., 1999, Verdu, et al., 1999) The outer and inner profiles of each

myelinated fiber were marked with the magnetic pen. The following morphometric parameters were assessed: fiber and axon area and diameter, myelin thickness, g ratio, and myelinated fiber density.

The plantar pads were stored in Zamboni's fixative overnight, then cryoprotected in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) containing 20% sucrose and stored at 4°C. Samples were processed as previously described.(Verdu and Navarro, 1997, Verdu, et al., 1999) Briefly, cryostat sections 40 µm thick were washed free-floating in PBS with 0.3% Triton-X100 (Fluka) and 1% fetal calf serum for 1 h, then incubated overnight at 4°C with rabbit anti-protein gene product 9.5 (PGP; 1:800; Ultraclone). After washes, sections were incubated in goat anti-rabbit cyanine 3.18 labeled IgG (1:200; Jackson Immunoresearch) overnight at 4°C. Following additional washes, sections were mounted on slides and viewed under an epifluorescence microscope. To assess antibody specificity, some samples were processed as described but without primary antibody. At least five sections from each sample were used for counting the total number of intraepidermal nerve fibers (IENF) observed in a length of 1 mm from the lateral side of the pad sample.

Data analysis and statistical comparisons

The results are shown as mean and SEM. Statistical comparisons between groups were made by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test for multiple comparisons or by Student's *t* test.

RESULTS

Metabolic results

In order to analyze the development of diabetic neuropathy in the two mouse strains, hyperglycemia was experimentally induced in ICR and NOD male mice by 5 consecutive doses of STZ. Animals with blood glucose levels above 250 mg/dl were considered diabetic and they underwent surgery on one leg, 30 days after diabetes induction, in order to evaluate the regeneration delay that has been described in diabetic mice (Kennedy and Zochodne, 2000). Electrophysiological studies were performed on days 17 and 24 after crush (47 and 54 days after STZ treatment), after which the animals were euthanized and samples processed for morphological and biochemical analysis. The experimental design is detailed in Fig. 1A. Optimal STZ dose was established as the minimal dose at which 90% of the animals developed

hyperglycemia, which was 45 mg STZ/kg body weight (bw) for ICR mice, and 35 mg STZ/kg bw for NOD mice.

Body weight and blood glucose levels for all experimental groups are shown in Fig. 1B and C, respectively. No changes in body weight were detected in diabetic or control NOD mice. ICR diabetic mice experienced about 6% reduction in body weight compared to healthy animals, although differences were not statistically significant. Out of 20 NOD animals treated with STZ, 12 showed high glucose levels (above 450 mg/dl; NOD-dh) already at day 15, while 8 exhibited mildly elevated glucose levels (NOD-dm), being more resistant to STZ treatment. These two subgroups were analyzed separately for electrophysiology and morphometrical analysis; however, no differences in body weight were detected between them, so all were included in the same group in Fig. 1B. Glucose levels from the 15 ICR diabetic mice increased homogeneously and similarly to the NOD-dh group, reaching the maximum glucometer capacity of glucose detection at the end of the experiment.

Aldose Reductase analysis

It is well known that AR activity is increased in diabetic neuropathy, both in animal models and in human patients. However, the onset of this increase has not been studied. In Fig. 2A we show that while there is not significant differences between levels of AR protein in sciatic nerve extracts of diabetic NOD-dh or ICR-d mice at early or medium time points (week 1 or 8 after induction of diabetes, respectively), the enzyme activity is increased 60 to 70%, depending on the strain, as early as one week after induction of diabetes, and persisted till the end of the experiment at 8 weeks of diabetes. No differences were found between the two strains. No differences in AR activity were detected in DRG of diabetic and control animals from both strains (data not shown), suggesting that AR activity is increased in Schwann cells but not in sensory neurons in the peripheral nervous system. On the other hand, AR mRNA was not increased in diabetic mice compared to non-diabetic controls (data not shown), correlating with the maintenance of AR protein levels (Fig. 2A and B).

Poly(ADP-ribosyl)ated proteins

We quantified poly(ADP-ribosyl)ated proteins as an index of PARP activation in response to free radicals and oxidative stress by western blot (Fig. 3). Significant differences were found in sciatic nerves of ICR-d mice and also in NOD-dh mice at the initial stages of diabetes. Importantly, like AR activity, they were already 2.5 to 3 times increased at 1 week of diabetes,

when blood glucose levels ranged between 300 and 400 mg/dl (Fig. 3B). At mid-term of diabetes levels of poly(ADP-ribose)ated proteins continued increasing up to 3.5 times in both models. No differences in poly(ADP-ribose)ated proteins in DRGs were found as for AR activity.

Neurophysiological evaluation of intact nerves

The electrophysiological test results for the intact left sciatic nerves are shown in Table 1. In control ICR and NOD mice the amplitude of the muscle and nerve compound action potentials did not change significantly between the two times evaluated, whereas the NCV showed a mild increase with time, which is consistent with nerve maturation.(Verdu, et al., 1996) The mean values for nerve conduction tests were very similar between the two strains of mice and were in the same range as those of other mouse strains tested in our laboratory in previous studies (Udina, et al., 2003, Verdu, et al., 1996, Verdu, et al., 1999).

In STZ-induced diabetic mice we found no significant changes compared with control mice at the first evaluation, that is at 45 days after induction of diabetes. However, at the second evaluation, one week later, there was a significant decline in motor and sensory NCVs of 15-20% with respect to the values found in the corresponding control groups (Table 1). These changes indicate that NCV tends to increase in control nerves but to decrease in diabetic nerves within this time span. In addition, NOD-dh mice, with high hyperglycemia, had a significant reduction in the amplitude of CMAPs of plantar and tibialis anterior muscles. There were no consistent changes in the amplitude and latency of the reflex H waves between control and diabetic mice.

In diabetic mice of both ICR and NOD strains, the hindpaw withdrawal latency in the algometry test showed a statistically significant increase at 52 days of hyperglycemia (an increase of about 40%, $p < 0.05$ with respect to control mice) (Fig. 4).

Neurophysiological evaluation of regenerated nerves

In order to assess the capacity for nerve regeneration, which is diminished in diabetes, we subjected all mice in the study to crush injury of the right sciatic nerve. Reinnervation of distal muscles and nerves was evaluated by nerve conduction tests at 17 and 24 days postinjury. Early muscle reinnervation was evidenced by the appearance of small, polyphasic CMAPs of long latency that tended to increase in amplitude and shorten in latency and duration with time (Fig. 5B). In control ICR mice we found evidence of reinnervation in the plantar muscles in the hindfoot of all the mice by 17 days and of the digital nerves in the toes by 24 days. Control NOD mice followed a similar course of regeneration, although mean values of reinnervation of distal

targets were lower in comparison with ICR mice (Table 2). The extension of nociceptive recovery expressed by the PP score was also significantly reduced in NOD mice, further indicating a mild reduction of the regeneration rate in this mouse strain with respect to ICR mice.

Diabetic mice showed a general, significant impairment of nerve regeneration when compared to non-diabetic animals (Table 2). Group ICR-d had significantly lower amplitude of responses and NCV than group ICR-c post-injury. Furthermore, axonal regeneration was delayed since only 12/15 ICR-d mice had reinnervation of plantar muscles by 17 days and only 2/15 of digital nerves by 24 days. Comparatively, there was more marked impairment of nerve regeneration in NOD diabetic mice with the same levels of hyperglycemia. Group NOD-dh had significantly lower results in amplitudes and NCVs for all targets tested, including also the proximal tibialis anterior muscle. Evidences of reinnervation were found only in 3/12 mice in the plantar muscle at 17 days and in 2/12 in the digital nerve at 24 days. The results for group NOD-dm were slightly better, though not significant, than group NOD-dh, suggesting an influence of the levels of hyperglycemia on peripheral nerve regeneration.

Morphological results of intact nerves

Mean values of the morphometric analysis of tibial nerves in the five groups of mice are shown in Table 3. The qualitative study of the samples did not show presence of ischaemic areas or endoneurial edema. General microstructure, cross-sectional nerve area and myelinated fiber density were similar between control and diabetic groups (Fig. 6). The number of myelinated fibers in the tibial nerve averaged about 1000 in both ICR-c and NOD-c groups, whereas it was slightly lower (by <10%) in groups ICR-d and NOD-dm and significantly reduced in the NOD-dh. Mean values for morphometrical analyses did not show any significant changes for the size of myelinated fibers and axons, myelin thickness and g ratio between intact tibial nerves of the different groups. The histogram distribution of fiber diameters showed a unimodal curve, without significant differences between control and diabetic groups, although it was a slightly reduced percentage of myelinated fibers larger than 10 μm in diameter in both diabetic groups (Fig. 7).

Morphological results of regenerated nerves

Light microscopy of tibial nerve semi-thin sections revealed the typical appearance for regenerated nerves after a crush injury. Myelinated fibers density was lower than in normal nerves and there was more connective tissue between the fibers (Fig. 8). Remnants of degenerating fibers and phagocytic cells were still present. Table 3 shows also the average

number of regenerated myelinated fibers and of morphometrical parameters. No statistically significant differences were found between the five groups. The number of myelinated fibers averaged about 650-720, except for group NOD-dh that had only 500. The mean values for fiber and axon diameter and myelin thickness showed a trend to be smaller in regenerated nerves of diabetic mice in comparison with control animals. This is illustrated in Figure 7, where a shift to the left in the histogram distribution of myelinated fiber diameters is evident for both diabetic groups ($p < 0.0001$, Kolmogorov-Smirnov test).

Epidermal innervation

To visualize nerve profiles in the skin of the hindfoot, we used immunolabeling of PGP, a pan-neuronal cytoplasmic marker. The distribution of immunoreactive (-ir) nerve fibers in samples of the control groups corresponded to the pattern previously described for the normal mouse foot pad. (Navarro, et al., 1997, Verdu and Navarro, 1997) Intense immunoreactivity to PGP was seen in nerves throughout the pads, in a dense subepidermal nerve plexus that gives rise to small nerve branches that penetrate the epidermis, and in a dense network that innervates the sweat glands (Fig. 9A-C). The number of PGP-ir intraepidermal nerve profiles was moderately reduced, by about 25%, in diabetic ICR and NOD mice compared to controls (Fig. 9D). Qualitatively, the density of PGP-ir fibers did not change markedly in dermal nerve trunks and in the sweat gland plexus between diabetic and control animals.

DISCUSSION

A useful mouse model of diabetic neuropathy should exhibit the key features present in human disease, including sensory loss, electrophysiological measures of nerve impairment and anatomical evidence of nerve fiber loss (Sullivan, et al., 2007). Here we show that the NOD mouse rendered diabetic by multiple low doses of STZ, and also combined with nerve injury, accomplishes these conditions in a 8-week course of diabetes, a relatively short period of time. Thus, it could be a suitable model to test pharmacological or gene therapies as well to study early signs of diabetic neuropathy.

Streptozotocin (STZ) is a broad spectrum antibiotic with diabetogenic properties due to its toxicity on pancreatic beta cells. Diabetes can be induced by STZ by two experimental protocols involving different pathogenic pathways. Direct beta-cell toxicity is exerted by i.p. injection of a single high dose of STZ (180-200 mg/kg bw), whereas i.p. injections of multiple low doses (40 mg/kg on 5 consecutive days) induce subtoxic effects on beta-cells leading to slow progressive hyperglycaemia, accompanied by lymphocytic infiltration of pancreatic islets, which resembles

type 1 diabetes in human patients (Like and Rossini, 1976). Approximately 80% of NOD females spontaneously develop type 1 diabetes from the 18th to 20th week of age, however weekly monitoring of blood glucose levels of these animals is needed from week 12th to establish the onset of hyperglycemia and high number of animals should be tested to finally obtain a significant number of diabetic animals without important mouse-to-mouse variation depending on the course of diabetes. Synchronizing the onset of diabetes in NOD mice by STZ administration allows the use of males, thus, avoiding hormone-derived effects on the metabolic parameters of these animals and homogenization of the curves of glycemia.

Chronic hyperglycemia and duration of diabetes mellitus are regarded as the main determinants for development of neuropathy in diabetic patients. The pathogenesis of diabetic neuropathy is multifactorial. A number of abnormalities appear to contribute into progressive microvascular disease associated with motor, sensory and autonomic fiber loss. These abnormalities include excessive polyol flux through the aldose reductase pathway, functional and structural alterations of nerve microvessels, nerve and ganglia hypoxia, oxidative stress, non-enzymatic glycosylation, and impairment in neurotrophic support for peripheral nerves and neurons. (Sima and Sugimoto, 1999, Simmons and Feldman, 2002, Tomlinson, 1999, Yagihashi, 1995, Zochodne, 1999) However, the precise mechanisms through which such factors are involved in the development of diabetic neuropathy are still unclear. Identifying early events in diabetic neuropathy is important not only to evaluate the progression of this complication of diabetes but also to detect potential markers to assess for efficacy of treatments. Electrophysiological abnormalities increase with the course of diabetes in human patients and animal models and biochemical tests are usually performed in animals at the end of the experimental design after several weeks of diabetes or in patient biopsies when the neuropathy is well established. Here we evaluated AR and PARP activation at week 1 of diabetes, when hyperglycemia was just above 300 mg/dl. These two enzyme activities were significantly increased in both NOD and ICR models of type 1 diabetes already after 7 days of hyperglycemia, suggesting that these are very early events of diabetic neuropathy. This seems to be also true for type 2 diabetes since pre-diabetic obese mice showed augmented sorbitol pathway activity in the peripheral nerve and poly(ADP-ribose) accumulation and 12/15-lipoxygenase overexpression in peripheral nerve and DRG neurons (Obrosova, et al., 2007). In our models of type 1 diabetes we did not see biochemical changes in DRGs at 1 or 8 weeks of diabetes, which are affected at longer time points (Kennedy and Zochodne, 2005). This observation also suggests that pharmacologic intervention to treat diabetic neuropathy should be started at pre-clinical phases, before the electrophysiological or sensory abnormalities appear.

Neurophysiological tests are basic for the diagnosis and evaluation of peripheral neuropathies. Abnormalities in nerve conduction tests can be found in a majority of diabetic patients, even in the absence of symptoms or signs on the physical examination. (Daube, 1999, Dyck, et al., 1993) Along years of follow-up, most type 1 diabetic patients show time-dependent worsening of neurophysiological results, indicated by a decrease in NCV, in amplitude of CMAPs and CNAPs, as well as electromyographic signs of denervation (Dyck, et al., 1993, Kennedy, et al., 1995, Reljanovic, et al., 1999).

There is a general agreement that diabetic neuropathy in animal models is also characterized by disruption in peripheral nerve function, usually detected by decreased NCV in diabetic rats and mice, although the magnitude varies depending upon the strain of animals, time of diabetes, diet and methodology used. In STZ-induced diabetic rats, sensory NCV is reduced early, followed by reduction of motor NCV (Andriambelason, et al., 2006, Biessels, et al., 1999, Kalichman, et al., 1998, Moore, et al., 1980), although it has been pointed out that they do not later exhibit the decrease in amplitude of muscle or nerve action potentials that are usually observed in humans. (Kennedy and Zochodne, 2005) Previous reports of neuropathy in mice made diabetic using the low dose STZ repeated injection protocol used in the present study, indicated a 20–25% decrease in sensory NCV in 129S7/B6 (Kellogg, et al., 2007) or 129/SvxC57BL6 (Obrosova, et al., 2005) mice by 6-7 weeks of diabetes, but no abnormalities in C57BL6 and only mild slowing in B6Ins2Akita mice at 24 weeks of diabetes (Sullivan, et al., 2007), two strains that appear to be more resistant to secondary complications of diabetes. Kennedy and Zochodne (Kennedy and Zochodne, 2000, Kennedy and Zochodne, 2005) followed Swiss Wistar mice after STZ-induced diabetes and reported well established electrophysiological abnormalities by 3-6 weeks, that evolved with time to significant slowing of motor and sensory NCV as well as reduced muscle and nerve compound action potentials amplitude. Our results show a 20% reduction of motor and sensory NCV in ICR and NOD mice with high levels of hyperglycemia by 2 months, and interestingly a significant reduction of CMAPs in the NOD-dh group. Decreased NCVs and compound action potentials have been correlated with decreased myelinated fiber density and changes in fiber and myelin size in neuropathies, and more recently also with reduced epidermal innervation measured on skin biopsies (Lauria, et al., 2005, Pittenger, et al., 2004).

In previous immunohistochemical studies no changes in the distribution and density of immunoreactive cutaneous nerve fibers were found after short periods of STZ-induced diabetes in rats, although by 12 weeks an increase in the density of fibers displaying immunoreactivity to PGP and to other neuropeptides, such as CGRP and VIP, was found. (Karanth, et al., 1990) This

early increase in cutaneous innervation may correspond to that described at initial stages in some diabetic humans, that precedes a later depletion as neuropathy progresses and dying-back axonal degeneration occurs (Kennedy, et al., 1996, Levy, et al., 1989, Loseth, et al., 2008, Properzi, et al., 1993) and might be related to the hyperalgesia found at early phases of diabetes. In mice, reduced cutaneous innervation was documented in type 1 diabetic Swiss mice as early as 4 weeks (Beiswenger, et al., 2008) evolving to severe denervation after 9 months of diabetes (Kennedy and Zochodne, 2005). In C57Bl6 mice rendered diabetic by STZ injection, a decrease of about 30-50% was found after 6-7 weeks of diabetes (Christianson, et al., 2003). A marked reduction in the density of PGP-ir nerves, with depletion of intraepidermal terminals, is most likely attributable to distal axonal degeneration induced by diabetes. (Navarro, et al., 1997)

Most previous studies did not show significant morphological or morphometric abnormalities in diabetic nerves of mature rats and mice following STZ administration, pointing out the difficulties in trying to extrapolate from these experimental models to human diabetic neuropathy. (Jakobsen, 1976, Kennedy and Zochodne, 2000, Malone, et al., 1996, Sharma and PK, 1987, Sharma and Thomas, 1974, Weis, et al., 1995, Wright and Nukada, 1994) Our results are in agreement with those previous studies, since no significant changes were found in the intact tibial nerve of ICR diabetic mice compared to their controls. Interestingly, however, NOD mice with high levels of diabetes during 8 weeks displayed a significant reduction, by about 30%, in the number of myelinated fibers, suggesting an increased susceptibility of this strain for diabetic axonal degeneration. A progressive decrease of myelinated fibers was described in alloxan-treated diabetic animals (Powell, et al., 1985), and a 50% loss of myelinated fibers was found in spontaneously diabetic BB/W rats after one year of disease (Sima, 1985, Sima and Sugimoto, 1999). Myelin abnormalities and nerve fiber loss characterize the pathology of peripheral nerves in human diabetic polyneuropathy. (Dyck and Giannini, 1999) A further feature of diabetic neuropathy observed in nerve biopsies is blunted axonal regeneration, which probably is consequent to impairments of immune response and of supply of neurotrophic factors.

Superimposed on the deficits of polyneuropathy is the failure of diabetic nerves to regenerate as effectively as nondiabetics. By combining short-term diabetes with nerve injury, we significantly stressed the deficits of diabetic neuropathy in both ICR and NOD mice at most studied parameters. The amplitudes of CMAPs and CNAPs were significantly lower in diabetic mice compared to the controls at 2-3 weeks post-injury, indicating a lower and delayed rate of axonal regeneration and reinnervation of target tissues. This is also supported by morphological findings of a tendency to reduced fiber diameter and myelin thickness in diabetic mice compared

with their controls. Impaired nerve regeneration has been previously observed in diabetic rats (Ekstrom and Tomlinson, 1989) and mice. (Kennedy and Zochodne, 2000) Several factors seem to be related with the reduced regenerative capacity in diabetic neuropathy, including abnormal neurotrophic response to injury, delayed recruitment of infiltrating macrophages, impaired activation of denervated Schwann cells, limited neurotrophic factor supply, slowed axonal transport, and excessive glycation of extracellular matrix components (reviewed in (Eckersley, 2002, Kennedy and Zochodne, 2005, Yasuda, et al., 2003)).

In conclusion, we show here that diabetes of mid duration induces more severe peripheral neuropathy in NOD than in ICR mice, and the rate of regeneration is slower in NOD than in ICR diabetic mice. Neurophysiological and morphological findings point out that NOD mice have an increased susceptibility for developing neuropathy by STZ-induced diabetes; thus it may be useful for investigating physiopathological mechanisms related to nerve damage and therapeutical strategies. Importantly, aldose reductase and PARP activity were significantly increased already at 1 week of hyperglycemia and persisted till the end of the experiment for both mouse models, suggesting that the molecular mechanisms leading to diabetic neuropathy are well established already at the initial stages of diabetes or even at pre-diabetes.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI051705 and PS090720 to AB, PI060201 to XN and PI061555 to MC) and TERCEL network, and the Generalitat de Catalunya (SGR 2009-1300). JH and LA are recipients of predoctoral fellowships from the AFM (AFM2008/13622AE) and the Generalitat de Catalunya (2006FI00762) respectively. AB was a recipient of the Ramon y Cajal Program. The authors thank J. Jaramillo and M. Puig for technical assistance and Drs. J. Farrés and X. Parés for providing material.

REFERENCES

1. Andriambelason, E., Baillet, C., Vitte, P. A., Garotta, G., Dreano, M., and Callizot, N., 2006. Interleukin-6 attenuates the development of experimental diabetes-related neuropathy. *Neuropathology* 26, 32-42.
2. Beiswenger, K. K., Calcutt, N. A., and Mizisin, A. P., 2008. Epidermal nerve fiber quantification in the assessment of diabetic neuropathy. *Acta Histochem* 110, 351-362.
3. Biessels, G. J., Cristino, N. A., Rutten, G. J., Hamers, F. P., Erkelens, D. W., and Gispen, W. H., 1999. Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Course of development and effects of insulin treatment. *Brain* 122 (Pt 4), 757-768.
4. Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
5. Ceballos, D., Cuadras, J., Verdu, E., and Navarro, X., 1999. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat* 195 (Pt 4), 563-576.
6. Christianson, J. A., Riekhof, J. T., and Wright, D. E., 2003. Restorative effects of neurotrophin treatment on diabetes-induced cutaneous axon loss in mice. *Exp Neurol* 179, 188-199.
7. Daube, J., 1999. Electrophysiologic testing in diabetic neuropathy. In: Dyck, P., and Thomas, P. K., (Eds.), *Diabetic neuropathy*. Saunders, Philadelphia, pp. 222-238.
8. Dockery, P., and Sharma, A. K., 1990. Ultrastructural abnormalities of myelinated fibres in the tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol Sci* 98, 327-345.
9. Drel, V. R., Mashtalir, N., Ilnytska, O., Shin, J., Li, F., Lyzogubov, V. V., and Obrosova, I. G., 2006. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 55, 3335-3343.
10. Dyck, P., and Giannini, C., 1999. Pathologic alterations in human diabetic polyneuropathy. In: Dyck, P., and Thomas, P., (Eds.), *Diabetic Neuropathy*. Saunders, Philadelphia, pp. 279-275.
11. Dyck, P. J., Kratz, K. M., Karnes, J. L., Litchy, W. J., Klein, R., Pach, J. M., Wilson, D. M., O'Brien, P. C., Melton, L. J., 3rd, and Service, F. J., 1993. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 43, 817-824.
12. Eckersley, L., 2002. Role of the Schwann cell in diabetic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 50, 293-321.
13. Ekstrom, A. R., and Tomlinson, D. R., 1989. Impaired nerve regeneration in streptozotocin-diabetic rats. Effects of treatment with an aldose reductase inhibitor. *J Neurol Sci* 93, 231-237.
14. Gabbay, K. H., Merola, L. O., and Field, R. A., 1966. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 151, 209-210.
15. Gabra, B. H., and Sirois, P., 2005. Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B1 receptor. *Eur J Pharmacol* 514, 61-67.
16. Garcia Soriano, F., Virag, L., Jagtap, P., Szabo, E., Mabley, J. G., Liaudet, L., Marton, A., Hoyt, D. G., Murthy, K. G., Salzman, A. L., Southan, G. J., and Szabo, C., 2001. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med* 7, 108-113.
17. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., and Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88.
18. Hounsom, L., and Tomlinson, D. R., 1997. Does neuropathy develop in animal models? *Clin Neurosci* 4, 380-389.
19. Jakobsen, J., 1976. Axonal dwindling in early experimental diabetes. I. A study of cross sectioned nerves. *Diabetologia* 12, 539-546.
20. Kalichman, M. W., Dines, K. C., Bobik, M., and Mizisin, A. P., 1998. Nerve conduction velocity, laser Doppler flow, and axonal caliber in galactose and streptozotocin diabetes. *Brain Res* 810, 130-137.
21. Karanth, S. S., Springall, D. R., Francavilla, S., Mirrlees, D. J., and Polak, J. M., 1990. Early increase in CGRP- and VIP-immunoreactive nerves in the skin of streptozotocin-induced diabetic rats. *Histochemistry* 94, 659-666.
22. Kellogg, A. P., Wiggin, T. D., Larkin, D. D., Hayes, J. M., Stevens, M. J., and Pop-Busui, R., 2007. Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes* 56, 2997-3005.
23. Kennedy, J. M., and Zochodne, D. W., 2000. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* 123 (Pt 10), 2118-2129.

24. Kennedy, J. M., and Zochodne, D. W., 2005. Experimental diabetic neuropathy with spontaneous recovery: is there irreparable damage? *Diabetes* 54, 830-837.
25. Kennedy, J. M., and Zochodne, D. W., 2005. Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst* 10, 144-157.
26. Kennedy, W. R., Navarro, X., and Sutherland, D. E., 1995. Neuropathy profile of diabetic patients in a pancreas transplantation program. *Neurology* 45, 773-780.
27. Kennedy, W. R., Wendelschafer-Crabb, G., and Johnson, T., 1996. Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy. *Neurology* 47, 1042-1048.
28. Lauria, G., Lombardi, R., Borgna, M., Penza, P., Bianchi, R., Savino, C., Canta, A., Nicolini, G., Marmiroli, P., and Cavaletti, G., 2005. Intraepidermal nerve fiber density in rat foot pad: neuropathologic-neurophysiologic correlation. *J Peripher Nerv Syst* 10, 202-208.
29. Levy, D. M., Karanth, S. S., Springall, D. R., and Polak, J. M., 1989. Depletion of cutaneous nerves and neuropeptides in diabetes mellitus: an immunocytochemical study. *Diabetologia* 32, 427-433.
30. Like, A. A., and Rossini, A. A., 1976. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193, 415-417.
31. Loseth, S., Stalberg, E., Jorde, R., and Mellgren, S. I., 2008. Early diabetic neuropathy: thermal thresholds and intraepidermal nerve fibre density in patients with normal nerve conduction studies. *J Neurol* 255, 1197-1202.
32. Malone, J. I., Lowitt, S., Korthals, J. K., Salem, A., and Miranda, C., 1996. The effect of hyperglycemia on nerve conduction and structure is age dependent. *Diabetes* 45, 209-215.
33. Moore, S. A., Peterson, R. G., Felten, D. L., and O'Connor, B. L., 1980. A quantitative comparison of motor and sensory conduction velocities in short- and long-term streptozotocin- and alloxan-diabetic rats. *J Neurol Sci* 48, 133-152.
34. Navarro, X., Verdu, E., and Buti, M., 1994. Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Exp Neurol* 129, 217-224.
35. Navarro, X., Verdu, E., Wendelschafer-Crabb, G., and Kennedy, W. R., 1997. Immunohistochemical study of skin reinnervation by regenerative axons. *J Comp Neurol* 380, 164-174.
36. Obrosova, I. G., Drel, V. R., Pacher, P., Ilnytska, O., Wang, Z. Q., Stevens, M. J., and Yorek, M. A., 2005. Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited. *Diabetes* 54, 3435-3441.
37. Obrosova, I. G., Ilnytska, O., Lyzogubov, V. V., Pavlov, I. A., Mashtalir, N., Nadler, J. L., and Drel, V. R., 2007. High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: effects of "healthy" diet and aldose reductase inhibition. *Diabetes* 56, 2598-2608.
38. Obrosova, I. G., Li, F., Abatan, O. I., Forsell, M. A., Komjati, K., Pacher, P., Szabo, C., and Stevens, M. J., 2004. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes* 53, 711-720.
39. Obrosova, I. G., Mabley, J. G., Zsengeller, Z., Charniauskaia, T., Abatan, O. I., Groves, J. T., and Szabo, C., 2005. Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. *Faseb J* 19, 401-403.
40. Pacher, P., Liaudet, L., Soriano, F. G., Mabley, J. G., Szabo, E., and Szabo, C., 2002. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes* 51, 514-521.
41. Pittenger, G. L., Ray, M., Burcus, N. I., McNulty, P., Basta, B., and Vinik, A. I., 2004. Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care* 27, 1974-1979.
42. Powell, H. C., Rosoff, J., and Myers, R. R., 1985. Microangiopathy in human diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol* 68, 295-305.
43. Properzi, G., Francavilla, S., Poccia, G., Aloisi, P., Gu, X. H., Terenghi, G., and Polak, J. M., 1993. Early increase precedes a depletion of VIP and PGP-9.5 in the skin of insulin-dependent diabetics--correlation between quantitative immunohistochemistry and clinical assessment of peripheral neuropathy. *J Pathol* 169, 269-277.
44. Reljanovic, M., Reichel, G., Rett, K., Lobisch, M., Schuette, K., Moller, W., Tritschler, H. J., and Mehnert, H., 1999. Treatment of diabetic polyneuropathy with the antioxidant thioctic acid (alpha-lipoic acid): a two year multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial (ALADIN II). *Alpha Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. Free Radic Res* 31, 171-179.

45. Schmidt, R. E., Dorsey, D. A., Beaudet, L. N., Frederick, K. E., Parvin, C. A., Plurad, S. B., and Levisetti, M. G., 2003. Non-obese diabetic mice rapidly develop dramatic sympathetic neuritic dystrophy: a new experimental model of diabetic autonomic neuropathy. *Am J Pathol* 163, 2077-2091.
46. Sharma, A., and PK, T., 1987. Animal model: Pathology and pathophysiology. In: Dyck, P., Thomas, P., Asbury, A., Winegrad, A., and Porte, D., Jr., (Eds.), *Diabetic Neuropathy*. Saunders, Philadelphia, pp. 237-252.
47. Sharma, A. K., and Thomas, P. K., 1974. Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes. *J Neurol Sci* 23, 1-15.
48. Sima, A. A., 1985. Can the BB-rat help to unravel diabetic neuropathy? *Neuropathol Appl Neurobiol* 11, 253-264.
49. Sima, A. A., and Sugimoto, K., 1999. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 42, 773-788.
50. Simmons, Z., and Feldman, E. L., 2002. Update on diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 15, 595-603.
51. Sullivan, K. A., Hayes, J. M., Wiggan, T. D., Backus, C., Su Oh, S., Lentz, S. I., Brosius, F., 3rd, and Feldman, E. L., 2007. Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis* 28, 276-285.
52. Tomlinson, D. R., 1999. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia* 42, 1271-1281.
53. Udina, E., Ceballos, D., Gold, B. G., and Navarro, X., 2003. FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers. *Exp Neurol* 183, 220-231.
54. Verdu, E., Buti, M., and Navarro, X., 1996. Functional changes of the peripheral nervous system with aging in the mouse. *Neurobiol Aging* 17, 73-77.
55. Verdu, E., and Navarro, X., 1997. Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin and muscle after peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 146, 187-198.
56. Verdu, E., Vilches, J. J., Rodriguez, F. J., Ceballos, D., Valero, A., and Navarro, X., 1999. Physiological and immunohistochemical characterization of cisplatin-induced neuropathy in mice. *Muscle Nerve* 22, 329-340.
57. Weis, J., Dimpfel, W., and Schroder, J. M., 1995. Nerve conduction changes and fine structural alterations of extra- and intrafusal muscle and nerve fibers in streptozotocin diabetic rats. *Muscle Nerve* 18, 175-184.
58. Wright, A., and Nukada, H., 1994. Sciatic nerve morphology and morphometry in mature rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol* 88, 571-578.
59. Yagihashi, S., 1995. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Rev* 11, 193-225.
60. Yasuda, H., Terada, M., Maeda, K., Kogawa, S., Sanada, M., Haneda, M., Kashiwagi, A., and Kikkawa, R., 2003. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 69, 229-285.
61. Zochodne, D. W., 1999. Diabetic neuropathies: features and mechanisms. *Brain Pathol* 9, 369-391.

Table 1. Results of electrophysiological tests performed in the **intact** hindlimb of control and diabetic ICR and NOD mice at 47 and 54 days after induction of diabetes.

Target / Parameter	ICR-c (n=10)		ICR-d (n=15)		NOD-c (n=13)		NOD-dm (n=8)		NOD-dh (n=12)	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Ant tibialis m.</i>										
CMAP (mV)	50.1 ± 2.6	54.7 ± 2.3	51.8 ± 0.9	53.8 ± 1.0	52.4 ± 2.4	55.2 ± 2.4	55.1 ± 3.4	54.8 ± 3.8	45.2 ± 4.8	37.8 ± 9.4 ^{ac}
<i>Plantar m.</i>										
CMAP (mV)	8.3 ± 1.2	8.8 ± 0.9	7.3 ± 0.5	7.2 ± 0.4	6.7 ± 0.5	6.8 ± 0.6	6.1 ± 0.4	5.5 ± 0.5 ^a	5.9 ± 0.7	3.0 ± 0.6 ^{abc}
MNCV (m/s)	39.5 ± 1.5	42.2 ± 1.9	38.4 ± 0.8	34.3 ± 1.2 ^a	40.2 ± 2.3	43.0 ± 1.3 ^b	42.8 ± 3.6	41.5 ± 2.3 ^b	37.2 ± 2.4	33.2 ± 2.2 ^{acd}
H wave (mV)	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.2
H latency (ms)	6.3 ± 0.4	6.6 ± 0.3	6.8 ± 0.1	7.8 ± 0.2	5.8 ± 0.1	6.0 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.0 ± 0.4	7.0 ± 0.6
<i>Digital nerve</i>										
CNAP (µV)	27.7 ± 3.0	27.4 ± 2.4	30.7 ± 2.2	28.9 ± 1.5	32.6 ± 2.6	29.5 ± 1.3	40.3 ± 2.5	36.4 ± 2.1	31.2 ± 1.9	23.8 ± 4.5
SNCVp (m/s)	38.6 ± 0.7	44.0 ± 1.1	37.3 ± 1.0	36.8 ± 1.2 ^a	43.3 ± 1.6 ^b	44.0 ± 1.1 ^b	44.2 ± 1.8	43.1 ± 1.1 ^b	41.1 ± 2.2	36.9 ± 2.2 ^{ac}
SNCVd (m/s)	36.3 ± 1.0	36.9 ± 0.9	34.1 ± 0.6	30.1 ± 0.9 ^a	35.8 ± 0.7	37.0 ± 0.7 ^b	31.5 ± 1.4	31.2 ± 0.9 ^c	31.9 ± 1.4	30.6 ± 1.5 ^{ac}

P<0.05 versus ^a ICR-c, ^b ICR-d, ^c NOD-c, ^d NOD-dm. ANOVA with Bonferroni posthoc tests.

Data are expressed as mean ± SEM. CMAP: compound muscle action potential; CNAP: compound nerve action potential; MNCV: motor nerve conduction velocity; SNCV: sensory nerve conduction velocity; -p: proximal nerve segment; -d: distal nerve segment. All CMAP and CNAP amplitudes are given for nerve stimulation at the sciatic notch.

Table 2. Results of electrophysiological tests performed in the **injured** hindlimb of control and diabetic ICR and NOD mice at 17 and 24 days after crush injury (dpi) to the sciatic nerve (47 and 54 days after the induction of diabetes). Data are expressed as mean \pm SEM.

Target / Parameter	ICR-c (n=10)		ICR-d (n=15)		NOD-c (n=13)		NOD-dm (n=8)		NOD-dh (n=12)	
	17	24	17	24	17	24	17	24	17	24
<i>Ant tibialis m</i>										
CMAP (mV)	7.5 \pm 0.6	15.5 \pm 1.1	4.3 \pm 0.5 ^a	14.3 \pm 1.3	3.4 \pm 0.3 ^a	14.9 \pm 1.3	3.2 \pm 0.6 ^a	11.8 \pm 1.5	3.2 \pm 0.4 ^a	7.9 \pm 1.2 ^{abc}
<i>Plantar muscle</i>										
CMAP (mV)	0.5 \pm 0.05	1.7 \pm 0.2	0.1 \pm 0.02 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	0.2 \pm 0.03 ^a	1.0 \pm 0.1 ^a	0.03 \pm 0.02 ^a	0.8 \pm 0.2 ^{ac}	0.02 \pm 0.01 ^{ac}	0.4 \pm 0.1 ^a
MNCV (m/s)	7.9 \pm 0.8	17.0 \pm 1.1	7.8 \pm 1.1	9.8 \pm 0.6 ^a	8.2 \pm 0.7	14.0 \pm 1.1	8.6 \pm 0.6	11.0 \pm 0.7 ^a	8.3 \pm 4.0	10.9 \pm 1.9 ^a
<i>Digital nerve</i>										
CNAP (μ V)	0 \pm 0	4.2 \pm 0.4	0 \pm 0	0.5 \pm 0.3 ^a	0 \pm 0	3.0 \pm 0.4 ^b	0 \pm 0	0.9 \pm 0.6 ^a	0 \pm 0	0.5 \pm 0.5 ^{ac}
SNCVp (m/s)		16.1 \pm 1.3		12.1 \pm 2.5		16.5 \pm 1.5		11.1 \pm 3.5		11.8 \pm 1.4
SNCVd (m/s)		7.0 \pm 0.5		4.0 \pm 0.3 ^a		6.6 \pm 0.5 ^b		4.0 \pm 0.7 ^{ac}		3.0 \pm 0.2 ^{ac}
Pinprick score	2.8 \pm 0.3	8.4 \pm 0.3	2.7 \pm 0.4	5.6 \pm 0.4 ^a	2.0 \pm 0.2	5.5 \pm 0.3 ^a	1.8 \pm 0.5	4.9 \pm 0.6 ^a	1.7 \pm 0.3	5.0 \pm 0.4 ^a

P<0.05 versus ^a ICR-c, ^b ICR-d, ^c NOD-c, ^d NOD-dm. ANOVA with Bonferroni posthoc tests. Data are expressed as mean \pm SEM. All CMAP and CNAP amplitudes are given for nerve stimulation at the sciatic notch.

Table 3. Results of the morphometrical evaluation of myelinated fibers (MF) in intact and regenerated tibial nerves in control and diabetic ICR and NOD mice at 54 days after the induction of diabetes and 24 days after crush injury to the right sciatic nerve.

Group	Number of MF	MF diameter (μm)	Axon diameter (μm)	g ratio	Myelin thickness (μm)
<i>Intact nerves</i>					
ICR-c (n=4)	1083 \pm 59	5.605 \pm 0.055	3.096 \pm 0.036	0.610 \pm 0.006	1.255 \pm 0.031
ICR-d (n=4)	999 \pm 49	5.470 \pm 0.119	2.928 \pm 0.174	0.577 \pm 0.010	1.271 \pm 0.028
NOD-c (n=4)	1021 \pm 46	5.592 \pm 0.056	2.978 \pm 0.122	0.555 \pm 0.020	1.257 \pm 0.055
NOD-d mid (n=3)	963 \pm 55	5.617 \pm 0.497	3.020 \pm 0.307	0.603 \pm 0.005	1.290 \pm 0.085
NOD-d high (n=4)	756 \pm 54 ^{ab}	5.790 \pm 0.144	3.127 \pm 0.067	0.586 \pm 0.007	1.280 \pm 0.057
<i>Crushed nerves</i>					
ICR-c (n=4)	720 \pm 78	4.094 \pm 0.255	2.347 \pm 0.111	0.610 \pm 0.016	0.873 \pm 0.074
ICR-d (n=4)	646 \pm 46	3.345 \pm 0.168	1.975 \pm 0.146	0.614 \pm 0.016	0.685 \pm 0.018
NOD-c (n=4)	697 \pm 37	4.020 \pm 0.046	2.204 \pm 0.055	0.563 \pm 0.014	0.906 \pm 0.050
NOD-d mid (n=3)	687 \pm 28	3.425 \pm 0.068	2.063 \pm 0.039	0.608 \pm 0.004	0.681 \pm 0.015
NOD-d high (n=4)	503 \pm 75	3.335 \pm 0.042	1.979 \pm 0.021	0.605 \pm 0.004	0.679 \pm 0.012

P<0.05 versus^a ICR-c, ^b NOD-c. ANOVA with Bonferroni posthoc tests.
Data are expressed as mean \pm SEM.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Experimental design and metabolic parameters. **A)** Experimental design of the study. Day 0 is considered as the administration day of the first dose of STZ. Age of the animals is indicated for each intervention. **B)** Body weight curves for the 4 groups of animals analyzed. **C)** Blood glucose levels of diabetic animals. ICR-d: diabetic ICR mice; NOD-dm: medium hyperglycemic diabetic NOD mice; NOD-dh: high hyperglycemic diabetic NOD mice. ICR-c: non-diabetic ICR mice; NOD-c: Non-diabetic NOD mice. Values are expressed as mean \pm SEM.

Fig. 2. Aldose Reductase protein and activity in sciatic nerves. **A)** Aldose reductase western blot analysis was performed using equal amounts of proteins (50 mg) obtained from sciatic nerves of ICR and NOD mice, non-diabetic (C), at week 1 (wk1) or at week 8 (wk8) after STZ administration. **B)** Two blots containing different samples ($n = 2 - 4$ for each experimental group) were quantified by densitometry. AR expression was normalized by actin in each line and then compared to non-diabetic control mouse levels. **C)** Aldose reductase activity analyzed in samples from A) expressed as nmol of NADP⁺ per minute and per mg of protein. Values are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by Students' *t* test (** $p < 0.01$).

Fig. 3. Quantification of poly(ADP-ribosyl)ated proteins in sciatic nerves. **A)** Western blots from sciatic nerve extracts from ICR and NOD mice, non-diabetic (C), at week 1 (wk1) or at week 8 (wk8) after STZ administration. **B)** Two blots containing different samples ($n = 3 - 4$ for each experimental group) were quantified by densitometry. Poly(ADP-ribosyl)ated protein expression was normalized by actin in each line and then compared to non-diabetic control mouse levels. Values are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by Students' *t* test (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Fig. 4. Histogram representation of the withdrawal latency (in seconds) to hot stimulus applied to the plantar skin in ICR and NOD control mice and diabetic mice at 7 weeks of hyperglycemia. Data are expressed as mean \pm SEM. $p < 0.05$ versus ^a ICR-c, ^b NOD-c; ANOVA with Bonferroni posthoc tests.

Fig. 5. Sample electrophysiological recordings. **A)** CMAPs of the plantar muscle evoked by stimulation at the ankle (1) and at the sciatic notch (2). Note the early M wave followed by a late H wave. Squares: 2 ms, 2 mV. **B)** CMAPs of the plantar muscle after sciatic nerve crush from (1)

a control mouse at 17 days, and (2) at 24 days postcrush, and (3) from a diabetic mouse at 24 days. **C)** CNAPs of the fourth digital nerves, evoked by stimulation at the ankle (1) and at the sciatic notch (2), in a control mouse.

Fig. 6. Representative light microscopy images of transverse sections of the intact tibial nerve from **A)** control ICR mouse, **B)** diabetic ICR mouse, **C)** NOD control mouse, **D)** diabetic NOD mouse. Scale bar = 9 μm .

Fig. 7. Histogram distribution (in percentage) of myelinated nerve fibers diameter in control and in diabetic ICR and NOD mice in the intact left tibial nerve (**A**, **B**) and in the right tibial nerve 24 days after sciatic nerve crush (**C**, **D**).

Fig. 8. Representative microphotographs of transverse sections of the regenerated tibial nerve from **A)** control ICR mouse, **B)** diabetic ICR mouse, **C)** NOD control mouse, **D)** diabetic NOD mouse. Scale bar = 9 μm .

Fig. 9. Representative fluorescence micrographs of epidermal nerve fibers. (**A**) Control ICR mouse, (**B**) Diabetic ICR mouse, and (**C**) Diabetic NOD mouse with marked reduction of IENF. Note also the mild reduction of immunoreactivity in the nerve plexus around the dermal sweat glands in **C**. **D)** Histogram representation of the density of intraepidermal nerve fibers (IENF/mm) in the five groups of mice evaluated.

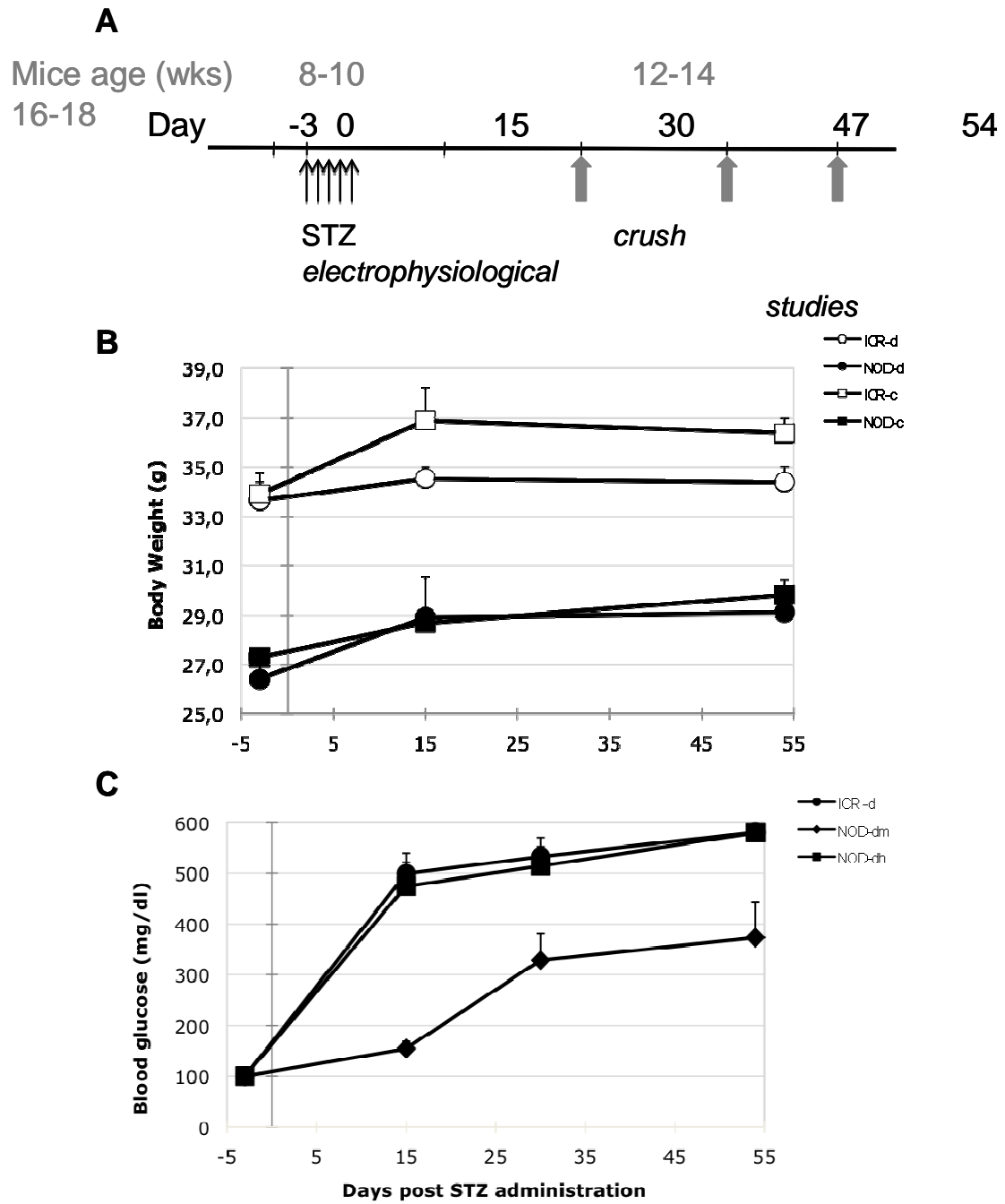


Fig. 1

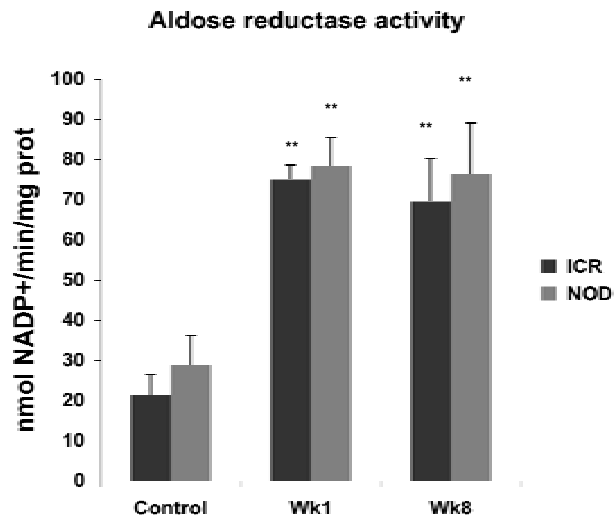
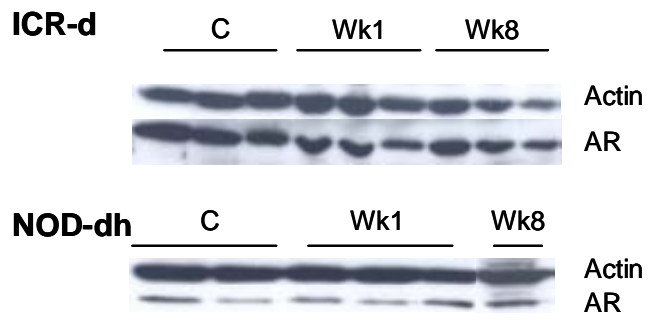
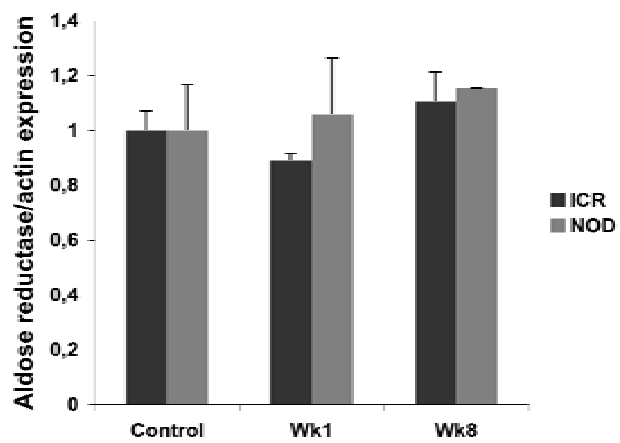
A**B****C**

Fig. 2

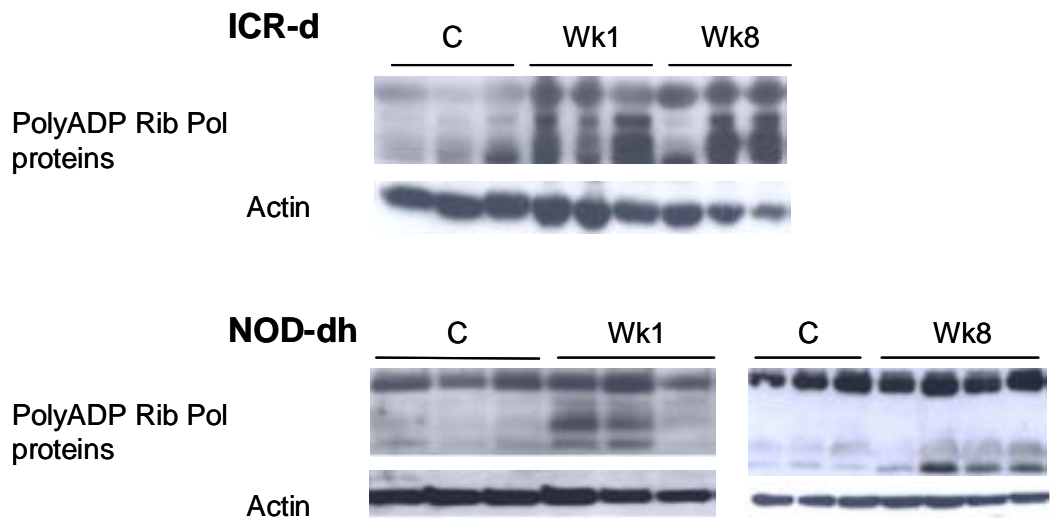
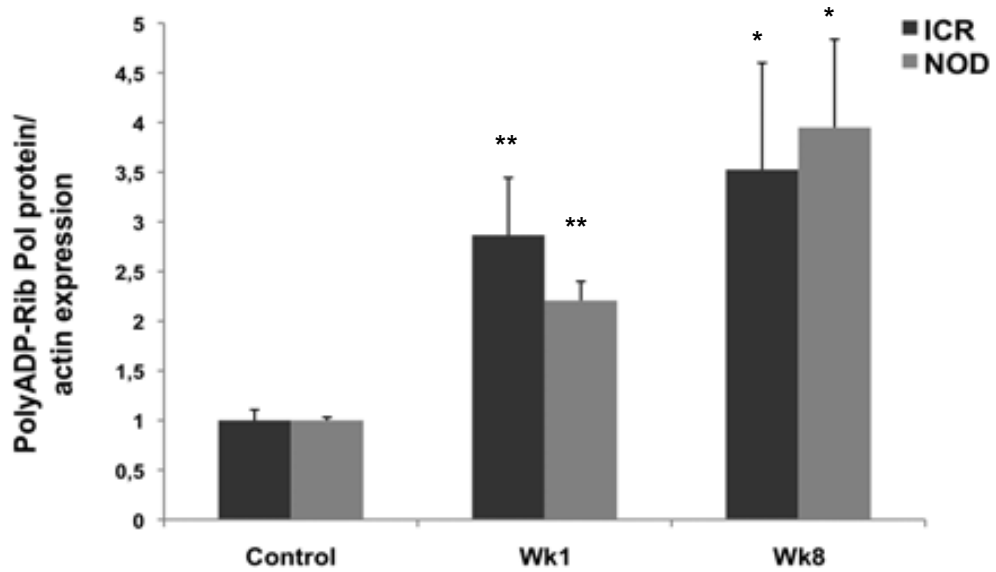
A**B**

Fig. 3

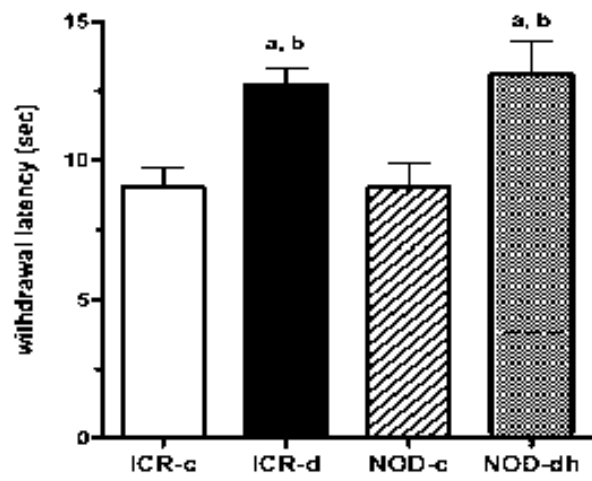


Fig. 4

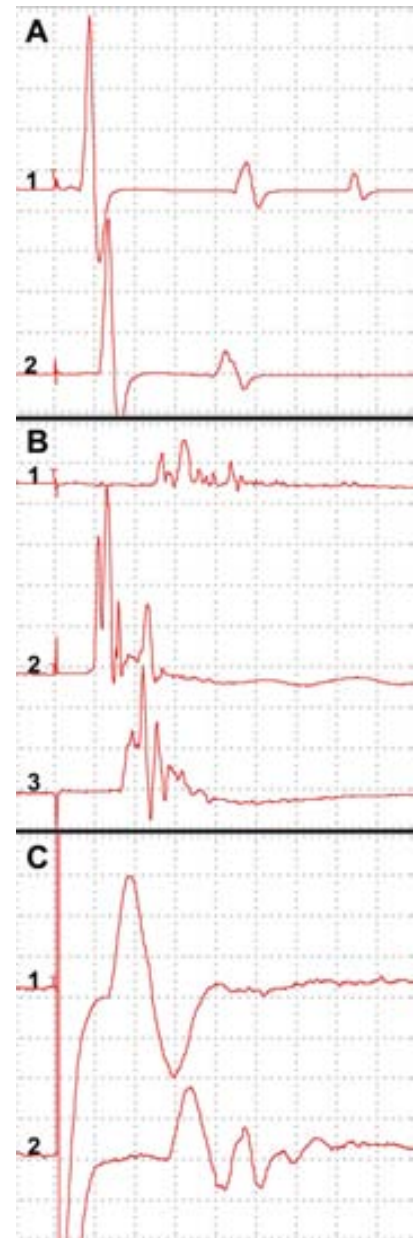


Fig. 5

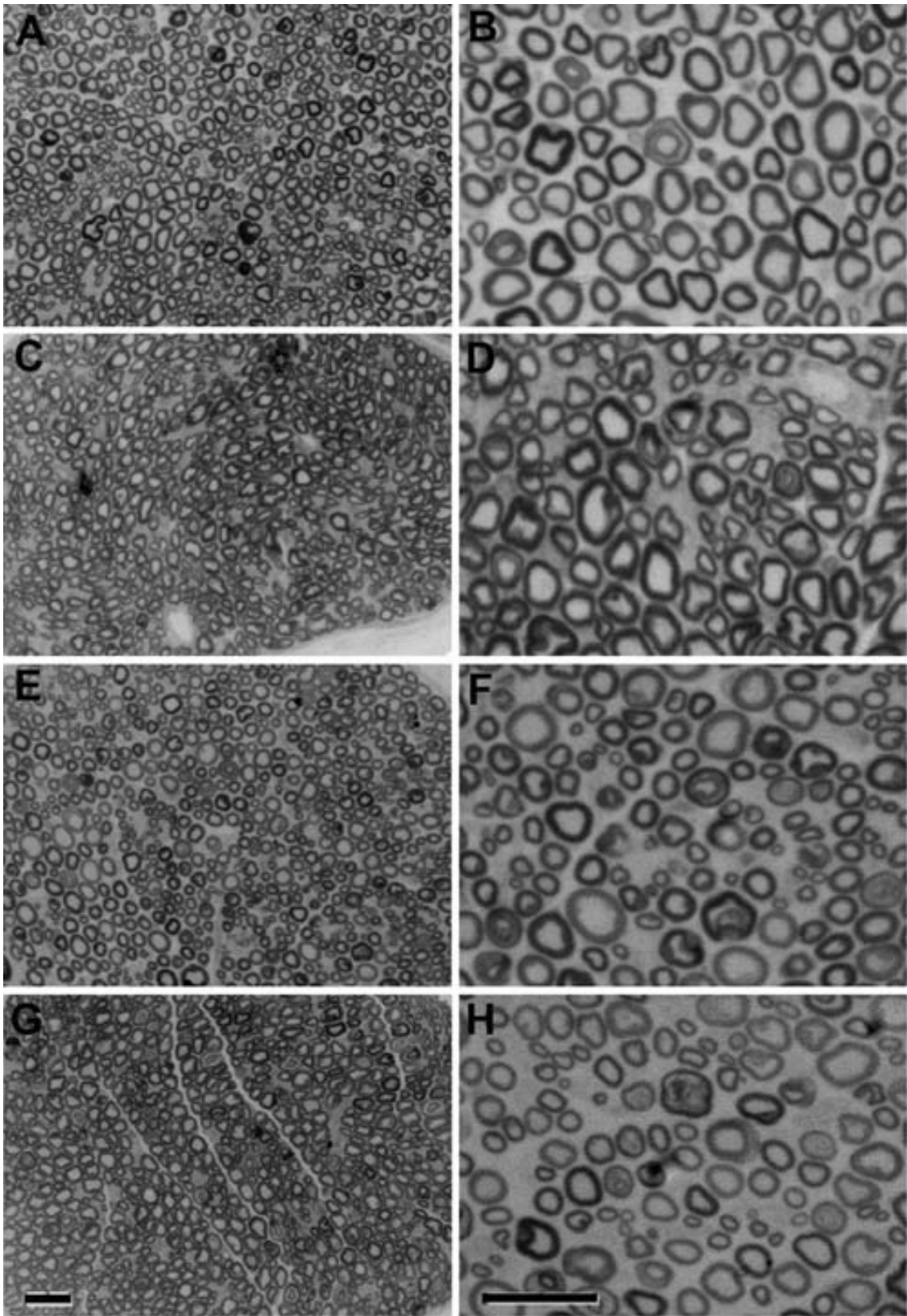


Fig. 6

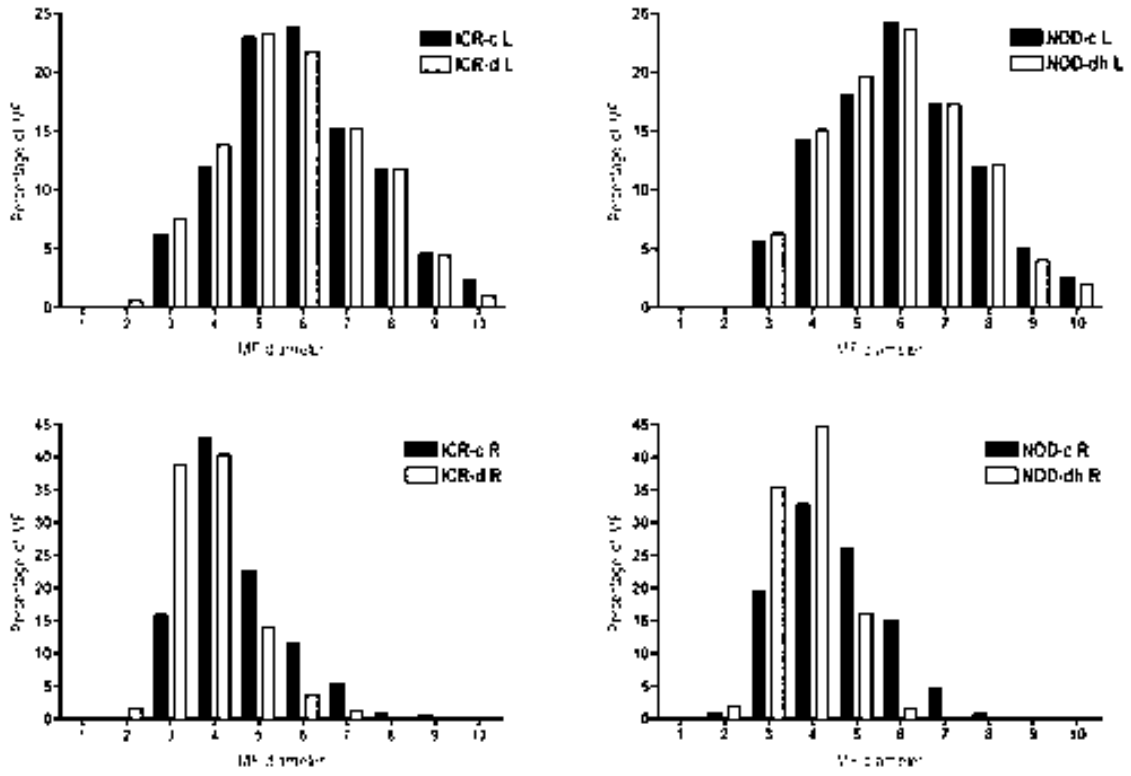


Fig. 7

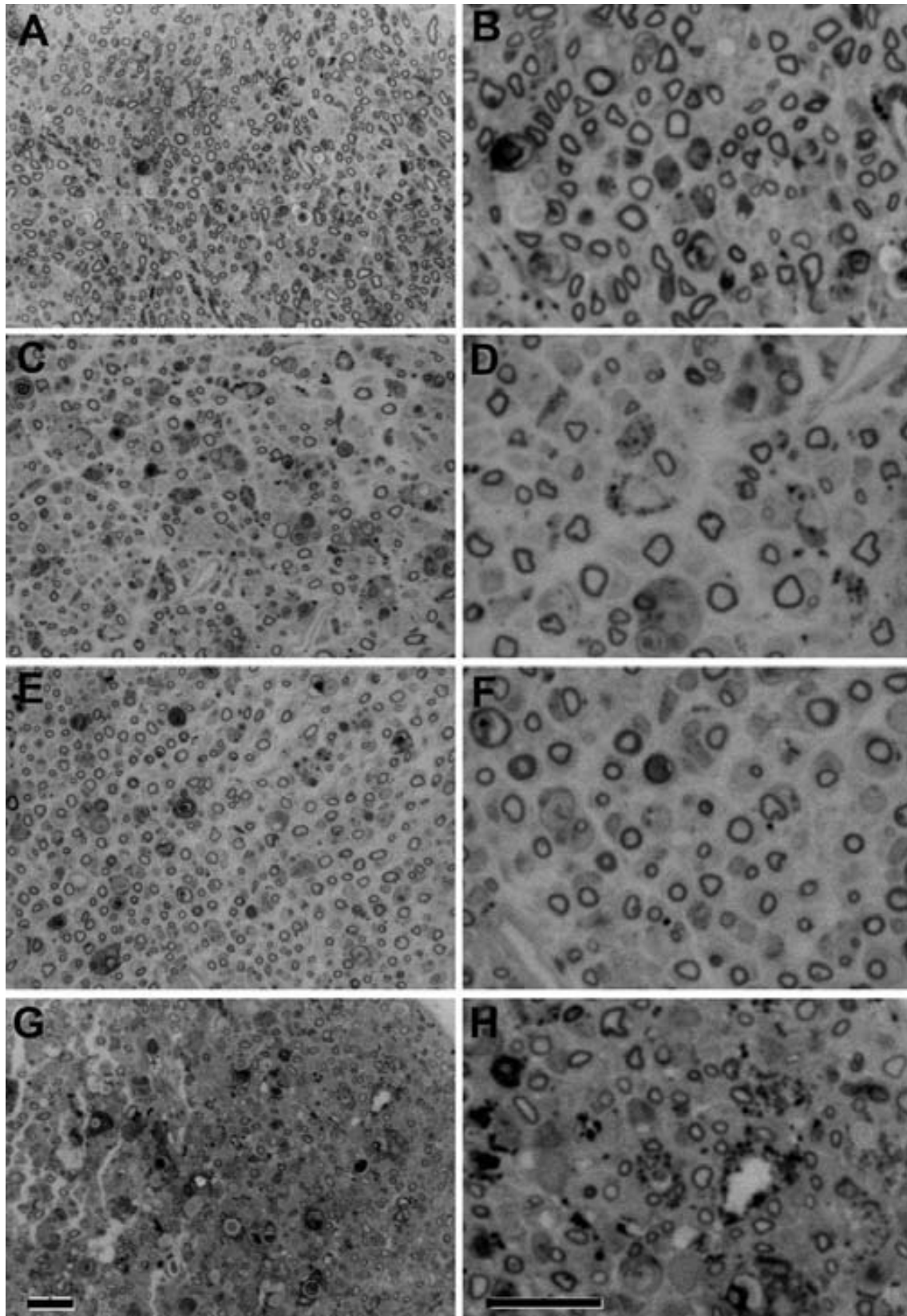


Fig. 8

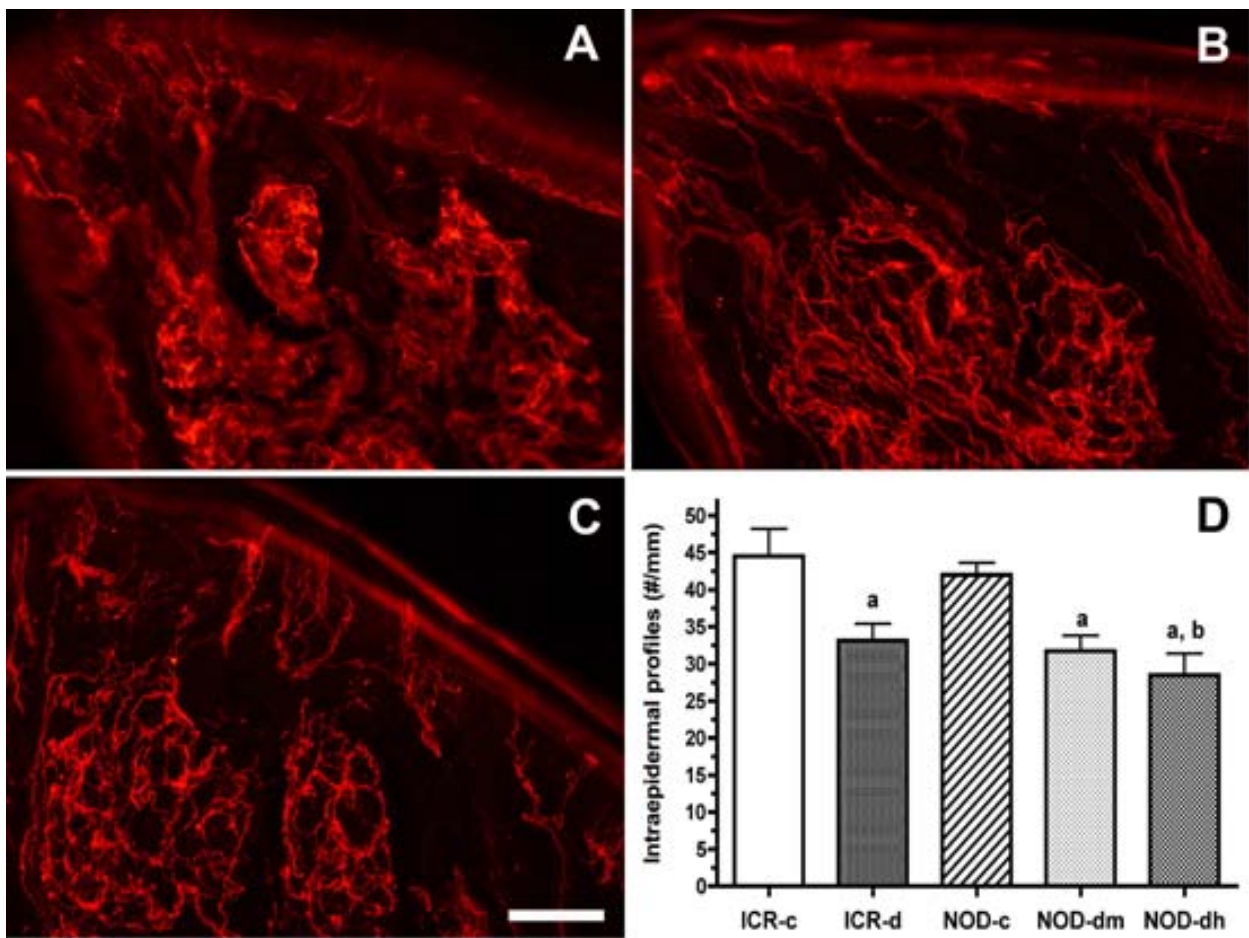


Fig. 9

