

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y BIOMEDICINA

**ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN  
DE NRG1<sup>typeIII</sup> EN EL DESARROLLO  
DE LA NEUROPATÍA DIABÉTICA**

Lorena Ariza Vázquez

Junio 2010



**ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN  
DE NRG1typeIII EN EL DESARROLLO  
DE LA NEUROPATÍA DIABÉTICA**

Memoria presentada por

**Lorena Ariza Vázquez**

Beneficiaria de una beca predoctoral  
para la formación de personal investigador FI2006-00762,  
concedida por la Generalitat de Catalunya

para optar al grado de

**Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina**

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Assumpció Bosch, del Centro de  
Biotecnología Animal y Terapia Génica y del Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona

El director

Doctorando

Assumpció Bosch i Merino

Lorena Ariza Vázquez

Junio 2010



<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>RESUMEN</b>	7
<b>INTRODUCCIÓN</b>	11
<b>1. SISTEMA NERVIOSO</b>	13
<b>1.1. Sistema nervioso periférico</b>	19
<b>1.2. Mielina</b>	
1.2.1. Proteínas de la mielina en sistema nervioso periférico	22
<b>1.3. Factores implicados en el control y desarrollo de la mielinización</b>	28
1.3.1. Neuregulinas y sus receptores	30
1.3.2. Factores de transcripción implicados en mielinización	36
<b>2. DIABETES MELLITUS</b>	40
<b>2.1. Neuropatía diabética</b>	42
2.1.1. Tratamiento	48
<b>3. TERAPIA GÉNICA</b>	50
<b>3.1. Vectores adenoasociados</b>	55
3.1.1. Serotipos de vectores adenoasociados	58
3.1.2. Transferencia génica con vectores adenoasociados	59
<b>OBJETIVOS</b>	63
<b>RESULTADOS</b>	67
<b>1. EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE SCHWANN</b>	69
1.1. Estudio de la expresión de P0 en cultivos de células de Schwann	69
1.2. Estudio de la expresión de las principales proteínas de la mielina en cocultivos de células de Schwann y neuronas sensoriales primarias	74

1.3. Estudio de la expresión de los principales factores de transcripción implicados en la mielinización en cocultivos de células de Schwann y neuronas sensoriales primarias	78
<b>2. EFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA EN CÉLULAS DE SCHWANN <i>IN VIVO</i></b>	80
2.1. Análisis del efecto de la hiperglucemia en nervios ciáticos de ratones ICR adultos	80
2.2. Análisis del efecto de la hiperglucemia en nervios ciáticos de ratones ICR jóvenes	85
2.3. Análisis del efecto de la hiperglucemia en nervios ciáticos de ratones NOD	88
<b>3. EFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA EN NEURONAS SENSORIALES Y MOTORAS</b>	90
3.1. Estudio de la expresión de NRG1 <sup>typeIII</sup> en neuronas sensoriales <i>in vitro</i>	90
3.2. Estudio de la expresión de NRG1 <sup>typeIII</sup> en neuronas sensoriales <i>in vivo</i>	93
3.3. Estudio de la expresión de NRG1 <sup>typeIII</sup> en neuronas motoras <i>in vitro</i>	94
3.4. Estudio de la expresión de NRG1 <sup>typeIII</sup> en neuronas motoras <i>in vivo</i>	96
<b>4. PRODUCCIÓN Y FUNCIONALIDAD DE VECTORES VIRALES CON NRG1</b>	97
4.1. Producción de los vectores virales con NRG1	99
4.2. Estudios de funcionalidad con los vectores virales con NRG1	103

<b>5. ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE AAVrh10-NRG1 EN UN MODELO DE NEUROPATÍA DIABÉTICA</b>	110
<b>5.1. Análisis de la expresión del transgén en los animales inyectados</b>	112
<b>5.2. Análisis del efecto de NRG1typelll sobre los nervios ciáticos en los animales diabéticos</b>	114
<b>5.3. Análisis electrofisiológicos y morfométricos de los animales diabéticos que sobreexpresan NRG1typelll</b>	118
<b>DISCUSIÓN</b>	123
<b>CONCLUSIONES</b>	153
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	157
<b>1. MATERIALES</b>	159
<b>1.1. Vectores plasmídicos</b>	159
<b>1.2. Cultivos celulares</b>	159
<b>1.3. Animales</b>	160
<b>2. MÉTODOS</b>	157
<b>2.1. Obtención y análisis del DNA</b>	161
2.1.1. Minipreparación de DNA plasmídico	161
2.1.2. Maxipreparación de DNA plasmídico	162
2.1.3. Megapreparación de DNA plasmídico	162
2.1.4. Clonaje por ligación	162
2.1.5. Preparación de bacterias quimiocompetentes	165
2.1.6. Transformación bacteriana	165
<b>2.2. Obtención y análisis del RNA</b>	166
2.2.1. Extracción del RNA	166
2.2.2. Análisis del RNA por real-time PCR	167
<b>2.3. Obtención y análisis de proteínas</b>	169
2.3.1. Extracción de proteínas	169
2.3.2. Cuantificación de proteínas	170
2.3.3. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	171
2.3.4. Electrotransferencia	171

2.3.5. Inmunodetección	172
<b>2.4. Técnicas generales de cultivo celular</b>	<b>174</b>
2.4.1. Mantenimiento de cultivos celulares en monocapa	174
2.4.2. Criopreservación: congelación y descongelación de viales	175
2.4.3. Cultivos primarios de células de Schwann murinas	175
2.4.4. Cultivos primarios de neuronas sensoriales y cocultivos con células de Schwann	176
2.4.5. Cultivos primarios de neuronas motoras	179
2.4.6. Introducción de DNA plasmídico en células por transfección	181
2.4.7. Experimentos <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones de glucosa	181
2.4.8. Análisis de la expresión de GFP por citometría de flujo	182
2.4.9. Infección de células con vectores virales	182
2.4.10. Ensayos de funcionalidad de los vectores virales	182
2.4.11. Inmunocitoquímica en cultivos celulares	183
<b>2.5. Producción de vectores virales</b>	<b>184</b>
2.5.1. Generación y purificación de vectores adenoasociados	184
2.5.2. Determinación del título de los vectores adenoasociados	186
2.5.3. Generación y concentración de vectores lentivirales	187
2.5.4. Determinación del título de los vectores lentivirales	188
<b>2.6. Técnicas generales utilizadas <i>in vivo</i></b>	<b>188</b>
2.6.1. Inducción de la diabetes	188
2.6.2. Inyección intratecal en ratones	188
2.6.3. Análisis electrofisiológicos	189
2.6.4. Eutanasia	190
2.6.5. Preparación y obtención de secciones de cultivos organotípicos	191
2.6.6. Inclusión y obtención de secciones en criostato	192
2.6.7. Inclusión y obtención de secciones en microtomo	193
2.6.8. Inclusión y obtención de cortes semifinos de nervios tibiales	194
2.6.9. Inmunohistoquímica de cortes de cultivos organotípicos	194
2.6.10. Inmunohistoquímica de cortes congelados	195
2.6.11. Inmunohistoquímica de cortes en parafina	196
2.6.12. Análisis morfométrico de los cortes semifinos	196
<b>2.7. Análisis estadístico</b>	<b>197</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>199</b>
<b>ANEXO</b>	<b>229</b>

**ANEXO 1.** Schwann cell targeting via intrasciatic injection of AAV8 as gene therapy strategy for peripheral nerve regeneration

231

**ANEXO 2.** Comparative study of peripheral neuropathy and nerve regeneration in NOD and ICR mice



# ***ABREVIATURAS***



%	Tanto por ciento
'	Minuto
''	Segundo
<b>AAV</b>	Adenoasociado
<b>AGE</b>	<i>Advanced glycation end products</i>
<b>APS</b>	Persulfato amónico
<b>AR</b>	Aldosa reductasa
<b>ARI</b>	Inhibidores de la aldosa reductasa
<b>AraC</b>	Arabinosilcitodina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>BCA</b>	Ácido bicincónico
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de cerebro
<b>BFABP</b>	Proteína de unión a ácidos grasos de cerebro
<b>BSA</b>	Albúmina bovina sérica
°C	Grados Celsius
<b>CAG</b>	<i>CMV/chicken <math>\beta</math>-actin promoter</i>
<b>Cel</b>	Célula
<b>CGRP</b>	<i>Calcitonina gene-related peptide</i>
<b>CH</b>	Hipomielinización congénita
<b>CMAP</b>	Potenciales de acción muscular compuesta
<b>CMT</b>	Charcot-Marie-Tooth
<b>CMV</b>	<i>Citomegalovirus Major Promoter</i>
<b>CNAP</b>	Potenciales de acción compuesta en nervio sensorial
<b>CNTF</b>	Factor neurotrófico ciliar
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CRD</b>	Dominio rico en cisteínas
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>Cx32</b>	Conexina 32
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-fenilindol diclorohidrato
<b>Db</b>	Diabético
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DM</b>	<i>Diabetes mellitus</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Di-metil-sulfóxido
<b>DNA</b>	Acido desoxiribonucleico
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>dsDNA</b>	DNA de doble cadena
<b>DSS</b>	Síndrome Déjérine-Sotas

## Abreviaturas

---

<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FELASA</b>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associatons</i>
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>g</b>	Gravedad (unidad de fuerza centrífuga)
<b>GAD</b>	Glutámico descarboxilasa
<b>GDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de la glia
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar gliar
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GLU</b>	Glutaraldehido
<b>h</b>	Hora
<b>HBSS</b>	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HNPP</b>	Neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión
<b>HS</b>	Suero de caballo
<b>HSV</b>	Herpes simplex virus
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento I similar a la insulina
<b>IGF-IR</b>	Receptor del factor de crecimiento I similar a la insulina
<b>IGF-II</b>	Factor de crecimiento II similar a la insulina
<b>Il</b>	Interleuquina
<b>ITR</b>	<i>Inverted terminal repeat</i>
<b>IU</b>	Unidades infecciosas
<b>kb</b>	Kilobase
<b>KCl</b>	Cloruro potásico
<b>l</b>	Litro
<b>LB</b>	Medio Luria Broth
<b>LRR</b>	Repeticiones ricas en leucinas
<b>LV</b>	Lentivirus
<b>M</b>	Molar
<b>MAG</b>	<i>Myelin associated glycoprotein</i>
<b>MBP</b>	<i>Myelin basic protein</i>
<b>MEM</b>	<i>Modified Eagle's medium con Earle's Salts</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MNCV</b>	Velocidad de conducción nerviosa motora
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección

<b>MP11</b>	<i>Myelin protein-11</i>
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NaOH</b>	Hidróxido sódico
<b>NCSC</b>	Stem cells derivadas de la cresta neural
<b>ND</b>	Neuropatía diabética
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NOD</b>	<i>Non-obese diabetic</i>
<b>NRDc</b>	Nardilisina
<b>NRG1</b>	Neuregulina 1
<b>NT-3</b>	Neurotrofina 3
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>OCT</b>	<i>Optimal cutting temperature compound</i>
<b>ORF</b>	Pauta abierta de lectura
<b>P/S</b>	Penicilina/Estreptomina
<b>P0</b>	<i>Myelin protein zero</i>
<b>PARP</b>	Poli-ADP-ribosa polimerasa
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEX</b>	Extracto de pituitaria
<b>PFA</b>	Paraformaldehido
<b>pg</b>	Picogramos
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>pmol</b>	Picomoles
<b>PMP22</b>	<i>Peripheral myelin protein-22</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>S</b>	Semana
<b>SNCV</b>	Velocidad de conducción nerviosa sensorial
<b>PP</b>	Partículas físicas
<b>PVDF</b>	Polivinilidenofluoruro
<b>Q</b>	Glutamina
<b>RBS</b>	Sitio de unión de la proteína Rep
<b>RLD</b>	Enfermedad de Roussy-Levy
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico

<b>SC</b>	Célula de Schwann
<b>sc-AAV</b>	<i>Self complementary AAV</i>
<b>SCID</b>	Inmunodeficiencia combinada severa
<b>SCP</b>	Precursor de la célula de Schwann
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>ssDNA</b>	DNA de cadena sencilla
<b>SN</b>	Sistema nervioso
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>TBS</b>	Tris buffered saline
<b>TDML</b>	Latencias motoras distales de la cola
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamida
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>TRPV1</b>	<i>Transient receptor potential cation channel</i>
<b>TRS</b>	<i>Terminal Resolution Site</i>
<b>TSAP</b>	Fosfatasa alcalina termosensible
<b>TSNCV</b>	Velocidad de conducción nerviosa en la cola
<b>TU</b>	<i>Transducing units</i>
<b>U</b>	Unidades
<b>V</b>	Voltios
<b>w</b>	<i>Well</i>
<b>wt</b>	<i>Wild-type</i>
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar

***RESUMEN***



La neuropatía diabética (ND) es una de las complicaciones a largo plazo más comunes que presentan los pacientes con *diabetes mellitus* (DM), se estima una prevalencia de un 60% del total de los pacientes. Fenotípicamente los pacientes presentan como síntomas más significativos un deterioro de la función nerviosa con disfunción sensorial y dolor en las extremidades. Los mecanismos patológicos, que llevan al desarrollo de la complicación pueden ser múltiples y no están claros por lo que no existe un tratamiento único y satisfactorio. El descubrimiento de un tratamiento eficaz requiere una mayor comprensión de las causas que desencadenan la complicación, entre ellas qué tipo celular está primariamente afectado, lo que permitiría tratar la enfermedad en las primeras etapas de la complicación, a diferencia del tratamiento actual que se realiza cuando la sintomatología está bien establecida.

El sistema nervioso periférico (SNP) contiene principalmente dos tipos celulares: neuronas y células de la glia, concretamente las células de Schwann (SC) que son las responsables de la producción de las proteínas de la mielina en SNP.

En la primera parte de este trabajo nos centramos en la caracterización molecular de los efectos de la concentración de glucosa sobre las SC *in vitro*, en cultivos establecidos y primarios y también en cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias. Más tarde se realizaron estudios *in vivo* en muestras de nervios ciáticos de tres modelos animales diferentes, ratones ICR adultos y jóvenes (18 días postnatales) a los que se les indujo la diabetes experimental mediante inyección de estreptozotocina (STZ) y también en ratones NOD, modelo de diabetes tipo I que desarrolla la enfermedad espontáneamente. En el estudio se analizaron tanto las proteínas de la mielina como los principales factores de transcripción implicados en mielinización, demostrándose alteraciones en la expresión de estas proteínas desde los primeros días de hiperglucemia.

En la segunda parte de esta tesis, se estudiaron los cambios inducidos por la hiperglucemia en la expresión de NRG1typeIII, un factor esencial para la mielinización en sistema nervioso periférico. Se realizaron estudios *in vitro* con

neuronas sensoriales primarias purificadas o en cocultivo con SC y cultivos primarios de neuronas motoras, cultivadas en diferentes concentraciones de glucosa. *In vivo* se analizaron muestras de ganglios de la raíz dorsal y de médula espinal de los tres modelos animales que hemos comentado anteriormente. En todos los casos se demostró una disminución de la expresión de NRG1typeIII y de su vía de señalización desde los primeros días de hiperglucemia.

En la parte final de este trabajo, y como prueba de concepto, se administraron vectores virales con el factor promielinizante NRG1typeIII en un modelo de neuropatía diabética donde los estudios, tanto a nivel molecular como electrofisiológicos y morfológicos, demostraron una mejora significativa comparándolos con animales diabéticos no tratados o tratados con vectores virales irrelevantes, por lo que parecería que el tipo celular primariamente afectado en la ND son las neuronas del SNP, ya desde los primeros días de hiperglucemia.

Hasta la actualidad no existe un tratamiento óptimo para la neuropatía diabética. Nuestros resultados sugieren que los mecanismos moleculares que desencadenan esta complicación de la diabetes aparecen ya desde los primeros días de hiperglucemia, y que un tratamiento alternativo para esta complicación podría basarse en estrategias de terapia génica con vectores virales.

# ***INTRODUCCIÓN***



## **1. SISTEMA NERVIOSO**

El sistema nervioso (SN) humano está formado por dos partes principales: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC a su vez se compone de encéfalo (cerebro, cerebelo y tronco del encéfalo) y médula espinal. Las dos regiones están protegidas por meninges y hueso, cráneo y columna vertebral respectivamente. El SNP está formado por nervios (craneales, espinales y autónomos), por ganglios que son acúmulos de neuronas (espinales o vegetativos) y por terminaciones nerviosas. Éste en cambio, no está englobado dentro de ninguna estructura ósea.

El SN está constituido por un único tipo de tejido, el tejido nervioso y éste presenta a su vez dos tipos celulares, las neuronas y las células gliales. Las neuronas son células excitables cuya función es captar y transmitir los impulsos nerviosos dentro del SN y las células de la glía cuyas principales funciones son: 1) Soporte mecánico, 2) Función trófica: controlan los niveles extracelulares de metabolitos ya que si se modificaran estos niveles las neuronas perecerían fácilmente, 3) Aislamiento y protección de las neuronas, 4) Síntesis de la vaina de mielina que recubre los axones. Aunque siempre se había postulado que sólo las neuronas eran excitables y que estas células no estaban implicadas en la señalización de los impulsos nerviosos, cada vez hay más evidencias que posiblemente las células gliales también tengan algún papel en la transmisión de éstos (D'Antoni *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Gomez-Gonzalo *et al.*, 2010; Kimelberg, 2010).

### **1.1. SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO (SNP)**

En el SNP hay dos tipos de neuronas, las células nerviosas motoras y las sensoriales, las primeras llamadas también neuronas eferentes, transmiten la información desde el SNC al resto del cuerpo (órganos, músculos y glándulas), las sensoriales o aferentes responden a todo tipo de estímulos recibidos (externos o de órganos internos) de diferentes partes del organismo y transmiten la información a SNC.

El **SNP motor** a su vez se divide en dos, el sistema nervioso somático que controla el músculo esquelético y los órganos sensoriales externos y el sistema nervioso autónomo que se divide en simpático y parasimpático.

El **sistema nervioso somático** está formado por neuronas sensoriales que llevan información desde los receptores sensoriales hasta el SNC y por motoras que conducen los impulsos nerviosos a los músculos esqueléticos para permitir los movimientos. En concreto, el SN somático abarca todas las estructuras del SNC y SNP encargadas de conducir información aferente del control motor al músculo esquelético. La vía de entrada, por donde recibe la información y que está relacionada con la temperatura, dolor, tacto, presión, los sentidos especiales (visión, audición, gusto y olfato) y la propiocepción que corresponde a la información que se recoge a partir de los músculos y de los tendones. Con toda esa información, se propicia una respuesta motora voluntaria que se corresponde con la contracción del músculo esquelético que corresponda.

El SN somático está compuesto por nervios espinales y craneales. Los primeros son los que envían información sensorial del tronco y las extremidades hacia el SNC a través de la médula espinal. También envían información de la posición y el estado de la musculatura y las articulaciones del tronco y reciben órdenes motoras desde la médula espinal para el control de la musculatura esquelética. Los nervios craneales son los que envían información sensorial procedente del cuello y la cabeza hacia el sistema nervioso central y reciben órdenes motoras para el control de la musculatura esquelética de esta parte. Hay 12 pares de nervios que son: olfatorio, óptico, motor ocular común, patético, trigémino, abducens, facial, auditivo, glossofaríngeo, neumogástrico, espinal e hipogloso.

La división del **SN autónomo simpático**, se origina con las neuronas que tienen su soma en la zona torácica y en los segmentos supralumbares de la médula espinal, en la división del **SN autónomo parasimpático** el origen de las neuronas está en el tronco del encéfalo y en los segmentos sacros de la

médula espinal, por eso estas divisiones también reciben el nombre de división toracolumbar y división craniosacral respectivamente.

Las diferencias en los neurotransmisores, en los efectos fisiológicos y en la anatomía nos dan las diferencias en la función del SN autónomo simpático y parasimpático. La acetilcolina es el neurotransmisor preganglionar de ambas divisiones del SN autónomo y también de las neuronas posganglionares del SN autónomo parasimpático, mientras que es la noradrenalina el neurotransmisor de las neuronas simpáticas posganglionares. Además en SN autónomo simpático pueden actuar como neurotransmisores la adrenalina y la dopamina.

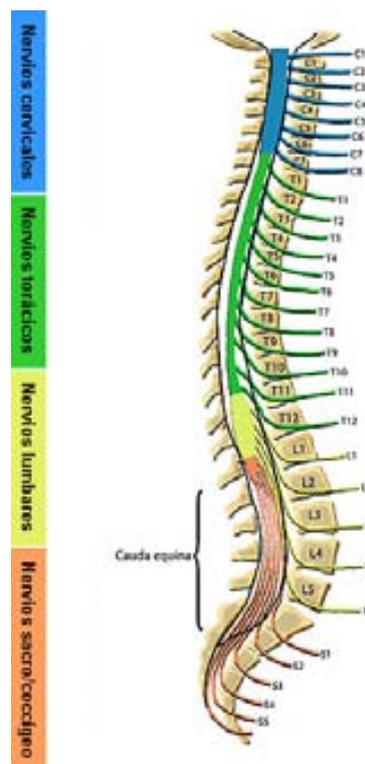
De hecho, generalmente SN autónomo simpático y parasimpático están innervando los mismos órganos pero producen efectos opuestos y es el equilibrio en las dos actividades lo que mantiene la estabilidad interna. Así por ejemplo, el SN autónomo simpático estimula el corazón aumentando la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción mientras que el SN autónomo parasimpático lo inhibe disminuyendo la frecuencia cardíaca. En el tracto gastrointestinal, el SN autónomo simpático inhibe la motilidad y es estimulada por el SN autónomo parasimpático. Se podría decir que el SN autónomo simpático tiene como función global preparar al organismo para una emergencia y las actividades del SN autónomo parasimpático están dirigidas a conservar y restablecer la energía del organismo

En las **neuronas** se pueden distinguir tres zonas bien diferenciadas, la zona receptora, donde se reciben los impulsos nerviosos, constituida por soma y dendritas; la zona conductora formada por un axón único por cada célula nerviosa; y una zona efectora constituida por los terminales axónicos que se encargan de la transmisión del señal nervioso a la célula diana.

Los **axones** de las neuronas se agrupan en haces nerviosos que reciben el nombre de tractos nerviosos en SNC y nervios periféricos en SNP. Los nervios periféricos son los nervios craneales y espinales, pueden contener axones eferentes (de SNC a SNP) o axones aferentes (de SNP a SNC). Los axones a su vez pueden estar mielinizados o no y limitados por vainas de tejido

conectivo que permiten el soporte de las fibras nerviosas y también de sus vasos sanguíneos y linfáticos.

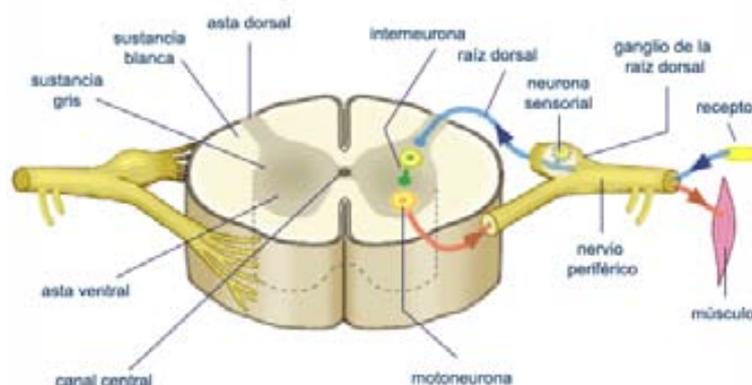
En la especie humana hay 31 pares de nervios espinales (8 nervios cervicales, 12 nervios torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 cocci), asociados cada uno a un segmento de médula espinal (Ver **Figura 1**). Estos nervios abandonan la médula espinal y pasan a través de los huecos intervertebrales de la columna vertebral. Cada nervio espinal esta conectado con la médula espinal por dos raíces, la raíz anterior o ventral y la raíz posterior o dorsal. La anterior formada principalmente por fibras eferentes y la posterior por fibras aferentes, son fibras vinculadas a la transmisión de los impulsos a SNC y reciben el nombre de **fibras sensoriales**. Los nervios craneales tienen los núcleos motores o sensoriales en el encéfalo y las fibras nerviosas periféricas salen de ahí hasta llegar a sus órganos efectores o sensoriales.



**Figura 1.** Representación de los nervios espinales humanos adaptado de [maturespine.com](http://maturespine.com).

Los cuerpos celulares de estas fibras nerviosas se encuentran en un engrosamiento de la raíz dorsal recibiendo el nombre de ganglio de la raíz

dorsal (Ver **Figura 2**). **Los ganglios sensoriales** de las raíces dorsales están envueltos por tejido conectivo formando tres capas llamadas epineurio, perineurio y endoneurio. El epineurio es la capa más exterior de tejido laxo que contiene los vasos sanguíneos que irrigan los nervios, además de conectar con los otros tejidos conectivos. El perineurio envuelve cada uno de los haces que forman los nervios y está formado por finas capas de células reticulares y una capa externa de fibras de colágeno. Contiene a su vez, los vasos sanguíneos que conectan con los capilares del endoneurio y su función es mantener la estructura del nervio y actuar como una barrera de difusión. El endoneurio está formado por fibras reticulares, colágeno, fibroblastos y una matriz extracelular que ocupa los espacios entre las fibras nerviosas que forman los haces nerviosos. El colágeno es el encargado de rodear cada una de las fibras nerviosas para formar los llamados tubos endoneuriales. Las neuronas de estos ganglios, son pseudounipolares y tienen una prolongación amielínica única que abandona cada cuerpo celular y se bifurca en una unión en forma de "T" para dar lugar a la ramificación periférica y central. El primer axón finaliza en una serie de dendritas en una terminación sensorial periférica y el último axón entra en el SNC.



**Figura 2.** Corte transversal de la médula espinal, se observa un nervio espinal, la vía aferente con el ganglio de la raíz dorsal y la vía eferente. Esquema adaptado de [people.eku.edu](http://people.eku.edu).

Uno de los nervios más importantes en SNP y que además se encuentra inervando las extremidades inferiores es el **nervio ciático**. Cada nervio está formado por tres ganglios distribuidos en las dos últimas vértebras lumbares y

la primera sacra (L4, L5 y S1) en humanos y las tres últimas vértebras lumbares (L4, L5 y L6) en ratones. Este nervio recorre las extremidades inferiores hasta llegar a la altura de la rodilla donde se trifurca en nervio sural, tibial anterior y posterior hasta llegar al tobillo. Finalmente estos tres nervios forman diferentes ramificaciones que inervan toda la superficie del pie. En los procesos de degeneración la afectación empieza en las ramificaciones nerviosas del pie y va progresando a los nervios surales y tibiales, hasta afectar finalmente al nervio ciático.

Los **ganglios autónomos** se sitúan a una cierta distancia del encéfalo y la médula espinal aunque igual que los ganglios sensoriales, también están envueltos por una capa de tejido conectivo que se continúa con el epineurio y el perineurio, pero las neuronas son multipolares y sus cuerpos celulares pueden llegar a ser de forma irregular. Las dendritas de las neuronas realizan sinapsis con los axones miélinicos de las neuronas preganglionares y se dirigen hacia los órganos diana, los vasos sanguíneos o las glándulas sudoríparas.

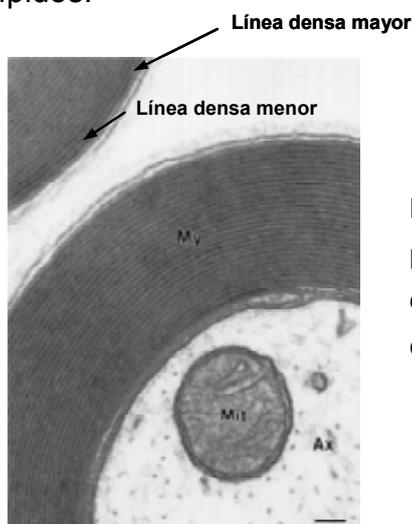
Por otra parte las **neuronas motoras** son las encargadas de conducir la información desde SNC (cerebro y médula espinal) hasta los órganos efectores. En los vertebrados las neuronas motoras son principalmente multipolares y utilizan acetilcolina como neurotransmisor.

Según los órganos dianas se clasifican en tres grandes categorías: motoneuronas somáticas, branquiales o viscerales. Las motoneuronas que forman parte del SN somático, inervan directamente los músculos esqueléticos, las branquiales inervan los músculos de la cara y cuello y las viscerales que inervan los músculos lisos presentes en las vísceras y el cardíaco. A su vez, las motoneuronas somáticas se dividen en dos subpoblaciones, las *alfa* cuyos cuerpos celulares se encuentran en el asta ventral de la médula espinal y que inervan las fibras musculares localizadas por todo el músculo y las *gamma* cuyos cuerpos se encuentran en los ejes musculares e inervan las fibras presentes en este eje.

## 1.2. MIELINA

La mielina es una sustancia proteolipídica, que envuelve las neuronas para facilitar la conducción de los impulsos nerviosos entre neuronas además de permitir la disminución del tamaño axonal. La mielina está formada por múltiples capas de membranas de una célula glial, el oligodendrocito en SNC y la célula de Schwann en SNP, que envuelven los axones. Los dos tipos celulares sintetizan las proteínas de la mielina, muchas específicas de SNC o SNP, y los lípidos para formar las vainas.

En estudios de microscopía electrónica se puede observar la estructura de los axones miélinicos, formados por dos capas protéicas internas de membrana plasmática fusionadas entre sí, dando lugar a lo que se conoce como línea densa mayor. Además se observa una segunda capa lipídica clara que recibe el nombre de línea densa menor formada por la proximidad de las superficies externas de las membranas plasmáticas adyacentes y constituida por lípidos.



**Figura 3.** Estructura de los axones miélinicos, donde podemos observar las líneas densas mayor y menor que forman la mielina. Esquema adaptado de cytochemistry.net.

Si se analizan secciones longitudinales de las fibras miélinicas se pueden observar las incisuras de Schimtt-Lanterman que son regiones de la vaina donde no se forma la línea densa mayor debido a una persistencia localizada del citoplasma celular. Estas incisuras permiten el intercambio de metabolitos desde la parte más externa de la SC hasta el axón.

En SNC cada oligodendrocito puede formar y mantener diferentes vainas de mielina de varias fibras nerviosas, sin embargo en SNP sólo una única célula de Schwann (SC) formará cada segmento de una fibra nerviosa. Estos segmentos suelen medir entre 0,5 y 1mm de longitud. Las SC no cubren la totalidad del axón, sino que dejan espacios donde el eje cilíndrico está en contacto directo con el espacio extracelular. Estas zonas reciben el nombre de nodos de Ranvier y permiten que la conducción de los impulsos nerviosos sea saltatoria; de hecho los nodos son cortos y están espaciados de manera que se pueden encontrar incluso más de 100 en todo el recorrido axonal. Aunque en SNC y SNP los nodos muestran una estructura similar, existen diferencias. En los nervios periféricos la unidad mielínica está cubierta por una lámina basal que contacta con la última capa de SC que extiende sus microvilli para cubrir los nodos. El espacio internodal que queda entre el axolema, que es la membrana neuronal que recubre el axón, y la lámina basal contiene matriz filamentosa. En cambio en SNC no hay lámina basal, en los nodos encontramos pies astrocitarios contactando con esta zona y recibiendo el nombre de sinantocitos (Butt *et al.*, 2002).

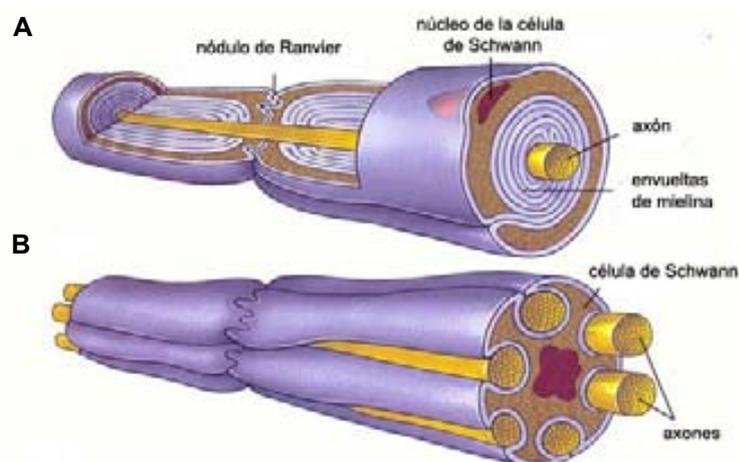
El nodo de Ranvier permite la conducción saltatoria del impulso nervioso, debido principalmente a que en esta zona se concentran la mayor parte de los canales de sodio y potasio de la membrana axonal. Además de estos canales, se encuentran muchas otras proteínas transmembrana y citosqueléticas como de adhesión celular (CAMs), en concreto Nrcam y neurofascina-186 (Davis *et al.*, 1996), y el adaptador citosquelético anquirina G (Kordeli *et al.*, 1990; Kordeli *et al.*, 1995), o la proteína de unión a actina, espectrina IV (Berghs *et al.*, 2000). Esta distribución hace que la conducción de los estímulos eléctricos sea unas diez veces mayor que la conducción nerviosa en los axones no mielinizados, aún teniendo un diámetro similar.

Los **axones** se pueden definir como **mielínicos** o **amielínicos** según presenten o no vaina de mielina y se clasifican en fibras A, B o C. Las fibras mielínicas son más numerosas y de mayor diámetro, poseen una envoltura de mielina formada por varias capas concéntricas lipídicas cuya función es aislar bioeléctricamente, proteger el axón y permitir la rápida velocidad de conducción

como ya hemos comentado anteriormente. Las fibras amielínicas, son menos numerosas y de menor diámetro.

Las fibras A aferentes, son las que tienen mayor diámetro y velocidad de conducción más rápida y se dividen a su vez en diferentes grupos según su función y los tejidos que abarquen (1a, 1b, 2 y 3). Las fibras A eferentes son fibras motoras y como las aferentes también se dividen en diferentes grupos (*alpha*, *beta*, *gamma* y *delta*). Las fibras B, son las fibras autonómicas preganglionares y las fibras C, son las autonómicas postganglionares y las fibras que transmiten la sensación de dolor, siendo todas amielínicas (Julius and Basbaum, 2001).

La formación de la mielina en SNP, se inicia con una invaginación de la SC alrededor del axón neuronal. A medida que el axón se hunde más en la célula de Schwann, la membrana plasmática externa de la célula forma un mesoaxón que sostiene el axón dentro de la célula. Se cree que posteriormente la célula de Schwann gira sobre el axón de modo que la membrana plasmática queda envuelta alrededor del axón como un espiral (**Figura 4A**). Al comienzo, la envoltura es laxa y posteriormente el citoplasma entre las capas va desapareciendo gradualmente. La envoltura se vuelve más compacta a medida que maduran las fibras nerviosas (**Figura 4B**).



**Figura 4.** Representación de la formación de la mielina en SNP. Esquema adaptado de netterimage.com.

### 1.2.1. Proteínas de la mielina del sistema nervioso periférico

La membrana mielínica está formada por un 80% de lípidos y un 20% de proteínas, estas proteínas permiten mantener la función estructural y la arquitectura de la mielina. Existe un solapamiento de algunas de estas proteínas entre SNC y SNP aunque también las hay específicas de tejido y su expresión está bastante restringida a las células productoras de mielina. Así, en SNP encontramos como proteínas más importantes de la mielina: MPZ también llamada P0 (myelin protein zero), MBP (myelin basic protein), PMP22 (peripheral myelin protein-22), MAG (myelin-associated glycoprotein) y la última descrita MP11 (myelin protein-11).

La mielina está formada por dos dominios, el compacto, donde se acumulan las múltiples capas de membrana plasmática y el no compacto situado en los nodos de Ranvier y en las incisuras de Schmitt-Lanterman, donde encontramos los canales citoplasmáticos que rodean la mielina compacta y anclan la vaina de mielina a la membrana del axón. En cada dominio están presentes unas proteínas en concreto, en el compacto se sitúan las proteínas P0, MBP y PMP22 mientras que en el no compacto encontramos como proteínas más relevantes a MAG, MP11 y conexina 32 (Cx32), además de otras proteínas con funciones de unión célula-célula como las cadherinas o cateninas.

**P0** es el principal componente estructural de la mielina, la mitad del peso de la mielina se corresponde con esta proteína. El gen que codifica para P0 está dividido en 6 exones distribuidos en 7kb de DNA, localizado en el cromosoma 1 y expresado exclusivamente en SC mielinizantes (Hayasaka *et al.*, 1993). Es una proteína de membrana de unos 28kDa que pertenece a la superfamilia de las proteínas inmunoglobulina (Ig), presenta un único dominio transmembrana y dos dominios importantes, uno extracelular Ig-like y una región intracelular. Esta proteína presenta un sitio de unión a N-glicanos, de hecho mediante la utilización de geles desnaturizantes se ha observado que tiene unido N-glicanos con epítopos de HNK1 (human natural killer 1) y tienen un papel muy importante en la formación de la compactación de la mielina. También se ha

descrito que para la correcta formación de la mielina es necesario que P0 esté formando tetrámeros (Gallego *et al.*, 2001).

A pesar de que P0 se sitúa en los dominios de mielina compactos, se ha descrito su importante función en la formación de las incisuras de Schmitt-Lantermann presentes en las zonas de no compactación, pues los ratones deficientes para P0 no las presentan y sí en los ratones deficientes para las otras proteínas de la mielina. Además, si se sustituye PLP por P0 en SNC, donde es su homóloga, las incisuras se forman correctamente (Yin *et al.*, 2008).

En el ratón no se han descrito mutaciones espontáneas en el gen P0, pero sí se ha demostrado que se requiere P0 para una correcta mielinización y su función es crítica en este proceso (Martini *et al.*, 1998). El *knock-out* heterocigoto para P0 se utiliza como modelo de Charcot-Marie-Tooth tipo 1B (CMT1B) (Martini *et al.*, 1995b). Se han descrito más de 50 mutaciones puntuales en diferentes regiones del gen P0 que pueden llegar a causar otros tipos de neuropatía en humanos como por ejemplo hipomielinización congénita (CH), Síndrome Déjérine-Sotas (DSS), CMT1B, enfermedad de Roussy-Levy (RLD), (Mandich *et al.*, 1999; Wrabetz *et al.*, 2000; Wrabetz *et al.*, 2006; Magot *et al.*, 2008; Marchini *et al.*, 2009). Estudios en familias con neuropatías hereditarias han mostrado que para la misma mutación el fenotipo puede llegar a ser muy diferente, incluso hasta el punto de desarrollar o no degeneración neuropática (Marques *et al.*, 1999).

**MBP** es la segunda proteína más abundante en la mielina de SNP, aproximadamente un 10-20% en peso; en SNC representa el 30-40%. Es una proteína asociada a membrana que se presenta en diferentes tamaños (21KDa, 18KDa, 17KDa y 14KDa) ya que sufre splicing alternativo. No se conoce la función de las diferentes isoformas siendo la de 18KDa la más abundante.

En ratones la mutación espontánea llamada “shiverer” contiene una deleción desde el exón 3 al exón 7 y no permite que esta proteína esté presente en la mielina. Muchos de estos animales mueren antes de los 6

meses, presentan una elevada desmielinización y una estructura anormal de la mielina en SNC, sin embargo en SNP la mielina parece estructuralmente normal ya que P0 sustituye la función de MBP. Se observa una reducción en el grosor de la mielina y un aumento en el número de incisuras de Schmitt-Lanterman debido seguramente a la sobreexpresión compensatoria de P0 (Martini and Schachner, 1997). Estos resultados se confirman al estudiar el doble transgénico P0/MBP (Martini *et al.*, 1995a).

En humanos el “Síndrome 18q”, debido a una delección en el cromosoma 18 en la región que contiene el gen MBP, causa afectaciones principalmente en SNC debido posiblemente a la disminución en la dosis de MBP. Además están descritas un número importante de modificaciones postraduccionales aberrantes, que pueden contribuir a la desmielinización por ejemplo en esclerosis múltiple (Harauz *et al.*, 2000; Tompa, 2005; Boggs, 2006). Últimamente, se está utilizando el potencial inmunizante de MBP para inducir encefalomiелitis en animales, ya que su administración induce una respuesta inmune muy similar a lo que ocurre durante el desarrollo de la esclerosis múltiple en humanos (Degano and Roth, 2009; Mannie *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010).

Recientemente se le han atribuido diferentes funciones de señalización a MBP, debido a que interacciona con proteínas que presentan un dominio SH3 como calmodulina, además de tener una señal de translocación a núcleo que se encuentra presente en el exón 2 (Staugaitis *et al.*, 1996; Boggs *et al.*, 2005; Boggs *et al.*, 2006; Harauz *et al.*, 2009). También está descrito que MBP presenta interacciones con proteínas de citosqueleto, de hecho, tiene características muy similares a proteínas asociadas a microtúbulos como la sinucleína (Boggs and Rangaraj, 2000; Libich *et al.*, 2003).

**PMP22** es una proteína integral de membrana de 22KDa que constituye el 5% del total de las proteínas mielínicas periféricas y que se encuentra codificada en el cromosoma 17. No es una proteína específica de la mielina, se ha detectado en motoneuronas y fuera del SN en el desarrollo embrionario, sin conocer qué función realiza. Es altamente hidrofóbica y presenta 4 dominios

transmembrana. Se le atribuye un importante papel tanto en proliferación, diferenciación, como en la mortalidad de las SC (Jetten and Suter, 2000; Sancho *et al.*, 2001; Amici *et al.*, 2007).

Se conocen diferentes mutaciones espontáneas en este gen en ratones. El ratón “trembler”, debido a mutaciones puntuales en PMP22, muestra desmielinización en SNP. La morfología axonal también está alterada con una mielina más delgada e incluso axones sin vaina. El homocigoto para esta mutación es letal. En humanos la mayoría de pacientes con Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (CMT1A) presentan una duplicación de 1,5Mb en el cromosoma 17 que incluye el gen PMP22, presentando un fenotipo de neuropatía periférica. La presencia de cuatro copias del gen están asociadas al fenotipo severo de DSS, en cambio la pérdida de una copia del gen está asociada a la neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión (HNPP) (Amici *et al.*, 2006).

**MAG** es una proteína integral de membrana de 100KDa que pertenece a la superfamilia de las Ig. Presenta 5 dominios Ig extracelulares, un único dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que puede ser diferente según el splicing alternativo que sufra la proteína. Es específica de células mielinizantes tanto en SNC como en SNP donde constituye el 1% y el 0,1% del total de proteínas de la mielina, respectivamente. MAG no se expresa uniformemente a lo largo de la mielina, en SNC se localiza en los espacios periaxiales sin compactar y en PNS en la mielina periaxial o en las incisuras de Schmitt-Lanterman.

En ratones, no existen mutantes espontáneos para la proteína MAG. En ratones *knock-out* para esta proteína la mielinización en SNC y SNP es normal, demostrando que no es una proteína esencial en el proceso. La estructura de la mielina de estos ratones presenta zonas donde la compactación no es total y se sobreexpresan otras moléculas de adhesión para paliar su déficit. Los animales a edades avanzadas sí que muestran atrofia axonal y una degeneración tanto en SNP como en SNC (Bjartmar *et al.*, 1999; Schachner and Bartsch, 2000; Pan *et al.*, 2005).

Además de la función en la estabilidad axón-mielina que se conoce que desempeña esta proteína, se ha observado que tiene un papel importante en la regulación del citoesqueleto axonal. Los segmentos de los axones mielinizados presentan fosforilación de los neurofilamentos que no se observa en los ratones *knock-out* para esta proteína, además de presentar una disminución en el tamaño axonal respecto a los ratones *wild-type* (Dashiell *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2002). Esta regulación, además, se ha visto alterada en los pacientes con neuropatías asociadas a mutaciones en esta proteína, donde se presentan anomalías en la separación entre los neurofilamentos (Lunn *et al.*, 2002).

Otra función también descrita para esta proteína, aunque con mucha controversia, es la inhibición de la regeneración axonal. Los cultivos de células nerviosas incubados con MAG recombinante muestran una inhibición en el crecimiento neurítico (Yiu and He, 2006), incluso la administración de esta proteína a un nervio periférico lesionado inhibe la regeneración (Tomita *et al.*, 2007). En los últimos años se ha estudiado a fondo este papel inhibitorio y se ha demostrado que esta proteína interacciona con el ácido siálico, en concreto con gangliósidos (GD1a y GT1b) presentes en glicosfingolípidos y con el receptor Nogo (NgR1) implicado también en la inhibición de la regeneración (Fournier *et al.*, 2001; Barton *et al.*, 2003; Lauren *et al.*, 2007). Sin embargo, en otros trabajos se muestra un papel protector frente al daño y a la degeneración axonal tanto *in vivo* como *in vitro* (Nguyen *et al.*, 2009; Schnaar and Lopez, 2009). Apoyando estos resultados se encuentra el hecho de que la expresión de MAG no está presente en el desarrollo temprano, durante la fase más activa de inhibición neurítica, y ya más tarde cuando se expresa es secuestrada dentro de las vainas de mielina y no está disponible para interactuar con otras proteínas durante el crecimiento de las neuritas en el desarrollo embrionario (Quarles, 2009).

**MP11** es una glicoproteína de 11kDa presente en la mielina y la última que se ha descrito mediante análisis de *microarrays* comparando los patrones de expresión génica en los nervios periféricos durante el desarrollo, la remielinización después de una lesión nerviosa y en un modelo murino de

hipomielinización (Ryu *et al.*, 2008). Hasta el momento no se conoce su estructura aunque después del análisis filogenético con más de 20 especies de vertebrados, parece ser que presenta una región transmembrana cerca del extremo C-terminal. El gen está localizado en el cromosoma 4 y presenta 3 exones. Los estudios realizados en el único trabajo que describe la proteína muestran que se expresa prácticamente sólo en SC, por lo que se considera una proteína específica de SNP. Se requiere su expresión para la correcta mielinización, está localizada en las zonas de mielina no compacta cerca de los nodos de Ranvier, concretamente en las incisuras de Schmitt-Lanterman y se sobreexpresa durante el desarrollo nervioso y después de una lesión nerviosa (Ryu *et al.*, 2008).

Otra proteína importante y presente en la zona no compacta de la mielina es **Cx32**. Las conexinas son una familia de proteínas normalmente localizadas en las gap-junctions y que oligomerizan para formar el llamado conexón o hemicanal en las membranas plasmáticas interaccionando con otro componente igual de la célula vecina para conectar los citoplasmas de las dos células y permitir el intercambio de iones, nucleótidos, metabolitos y otras moléculas señalizadoras. Muchos estudios han descrito a Cx32 como la proteína más abundante en las gap-junctions presentes en SNP (Scherer *et al.*, 1995; Chandross *et al.*, 1996; Yoshimura *et al.*, 1996), además de estar altamente expresada en los nervios ciáticos de ratones adultos (Mambetisaeva *et al.*, 1999).

En humanos, la forma dominante para CMTX está asociada a mutaciones en Cx32 (Bergoffen *et al.*, 1993). La generación de modelos murinos deficientes para esta proteína permitieron el estudio de su función. Estos animales no mostraban anomalías del SN en las etapas tempranas del desarrollo, pero a los tres meses desarrollaban una neuropatía periférica progresiva caracterizada por un tamaño inferior de las vainas de mielina y unos nodos de Ranvier y zonas no compactas anormales (Scherer *et al.*, 1999; Willecke *et al.*, 1999). Esta patología era similar a la de los pacientes con CMTX (Ressot *et al.*, 1998; Abrams *et al.*, 2000). En los cultivos de SC de estos ratones se pudo observar que la falta de Cx32 inducía una desregulación en la

expresión génica de las proteínas de la mielina y estimulaba el fenotipo de SC no mielinizante (Nicholson *et al.*, 2001). También se ha observado que modelos murinos con mutaciones en Cx32 presentan deficiencias en la mielinización tanto en SC de SNP como en oligodendrocitos de SNC (Sargiannidou *et al.*, 2009).

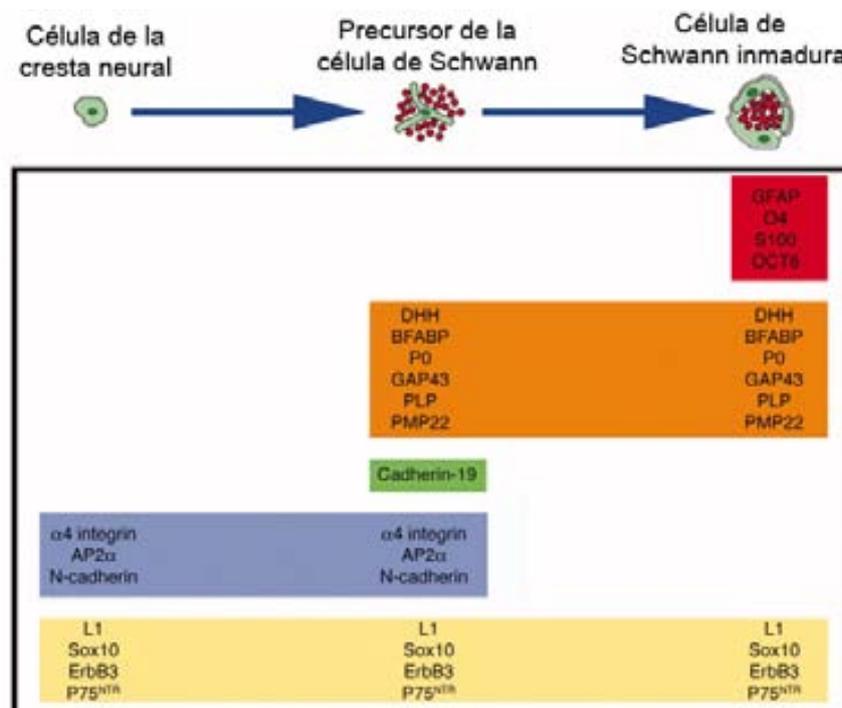
Asimismo, cabe destacar que casi todos los mutantes aquí descritos para las proteínas de la mielina, además de presentar deficiencias en la mielinización, presentan alteraciones en los nodos de Ranvier y en los canales implicados en la conducción saltatoria del impulso nervioso (Wang *et al.*, 1995; Neuberg *et al.*, 1999; Samsam *et al.*, 2002; Poliak and Peles, 2003; Ulzheimer *et al.*, 2004).

### **1.3. FACTORES IMPLICADOS EN EL CONTROL Y DESARROLLO DE LA MIELINIZACIÓN**

Las células gliales en el SNP, incluyendo las células satélite de los ganglios periféricos y las SC mielinizantes y no mielinizantes, derivan de las células de la cresta neural. Durante el desarrollo de los animales vertebrados las células de la cresta neural emergen de la parte dorsal del tubo neural desde donde son delaminadas y van migrando hacia diferentes localizaciones en el embrión. Dependiendo de los estímulos recibidos, estas células gradualmente se van restringiendo a células neuronales sensoriales, autonómicas, del sistema nervioso entérico y también a células no neuronales como los melanocitos de la piel, células presentes en el tejido conectivo y cartilaginoso (Sommer, 2001; Le Douarin and Dupin, 2003). Dentro de estas células encontramos las “stem cells” neuronales derivadas de la cresta neural (NCSC). Se encuentran en sitios de gliogénesis, incluyendo el nervio ciático y los ganglios de la raíz dorsal (Hagedorn *et al.*, 1999; Morrison *et al.*, 1999) y se especializan en las células precursoras de las SC (SCP) por un mecanismo desconocido. Estas células, posteriormente, se diferenciarán para formar las SC inmaduras y éstas a su vez se especializarán en SC mielinizantes y no mielinizantes. Durante el desarrollo embrionario, las SCP se encuentran

presentes en los nervios espinales entre los días embrionarios 12/13 (E12/13) y dan lugar a las SC inmaduras alrededor de E15/16 (Dong *et al.*, 1999).

Las SCP se pueden distinguir de sus progenitoras y de su progenie por diferentes marcadores moleculares, expresan BFABP (proteína de unión a ácidos grasos de cerebro), P0 y cadherina-19 que no están presentes en los NCSC (Jessen and Mirsky, 2005) y, a diferencia de sus células precursoras, diferentes factores tróficos como FGF, IGF, PDGF y endotelina promueven su supervivencia, a la vez que ésta no depende de la expresión de NRG1 como en los NCSC (Woodhoo *et al.*, 2004; Woodhoo and Sommer, 2008). Respecto a su progenie, las SC inmaduras sobreexpresan GFAP y S100 y menos N-cadherina, cadherina-19 y AP2 $\alpha$  (Jessen and Mirsky, 2005). Además las SC inmaduras *in vitro* pueden promover su propia supervivencia por circuitos autocrinos mientras que las SCP no los poseen (Dowsing *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 1999) (Ver **Figura 5**).



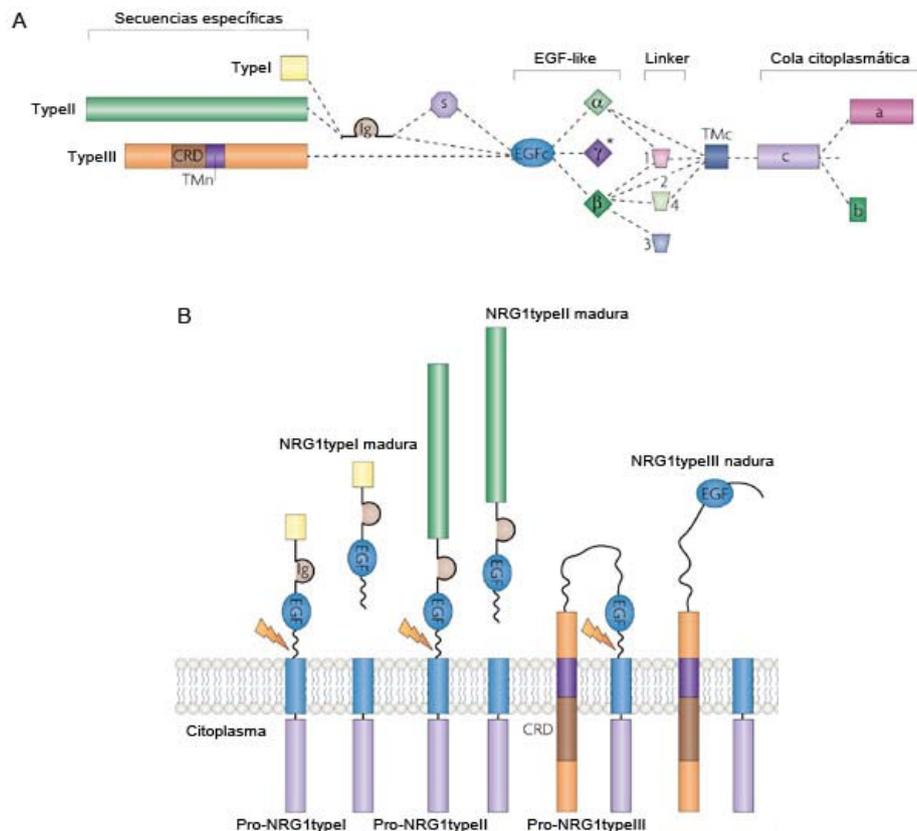
**Figura 5.** Esquema de los marcadores moleculares expresados durante el desarrollo de las SC. Adaptación del esquema de (Woodhoo and Sommer, 2008).

En el último paso hacia la mielinización es necesario que las SC inmaduras se diferencien en SC mielinizantes y no mielinizantes. El fenotipo molecular de las SC inmaduras y las SC no mielinizantes es muy similar, aunque hay moléculas como GalC y las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 7\beta 1$  que se encuentran expresadas únicamente en las SC no mielinizantes (Jessen and Mirsky, 2005). La generación de SC mielinizantes conlleva muchos más cambios moleculares, las moléculas presentes en la lámina basal y sus receptores, integrinas y factores promielinizantes como Oct6, Egr2 (Krox20) y sus correguladores Nab1/2, Brn2, Sox10 y NRG1 tienen un papel crítico y muy importante en la mielinización y en el control del grosor de la mielina (Birchmeier and Nave, 2008)

### 1.3.1. Neuregulinas y sus receptores ErbB

Las neuregulinas (NRG) son proteínas de señalización que median la interacción célula-célula en sistema nervioso, corazón, tejido mamario y otros órganos. La primera que se identificó fue NRG1 y posteriormente hasta 3 NRGs más, aunque se conoce muy poco de NRG2, 3 y 4. A pesar de unirse a los mismos receptores en el mismo tipo celular, las vías de señalización activadas por NRG1 y NRG2 son diferentes (Crovello *et al.*, 1998).

El gen que codifica para NRG1 tiene 1,4Mb de longitud y presenta un elevado splicing alternativo que llega a producir más de 15 isoformas diferentes de NRG1, entre ellas las más conocidas y estudiadas las tres isoformas NRG1 $\beta$ 1: NRG1typeI, NRG1typeII y NRG1typeIII. Las tres características estructurales que presentan los tres tipos son un dominio EGF-like (epidermal growth factor), una secuencia N-terminal específica para cada tipo y al menos un dominio transmembrana (Ver **Figura 6**). El dominio EGF-like es el encargado de interactuar con los receptores tirosina quinasa ErbB y desencadenar la señalización celular. Además NRG1typeI y NRG1typeII presentan un dominio Ig-like mientras que NRG1typeIII presenta un dominio rico en cisteínas que actúa como un segundo dominio transmembrana (Buonanno and Fischbach, 2001; Falls, 2003).



**Figura 6.** Representación de la formación (A) y la estructura (B) de las isoformas de NRG1. Adaptación de (Mei and Xiong, 2008).

Las diferentes isoformas de NRG1 son reconocidas y cortadas proteolíticamente por proteasas como TACE (ADAM17) y BACE1 (Horiuchi *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006), de manera que NRG1typeI y II se liberan de la membrana celular y pueden actuar como moléculas con señalización paracrina, mientras que NRG1typeIII queda anclada a la membrana por su segundo dominio transmembrana y puede señalizar vía yuxtacrina (Nave and Salzer, 2006). En relación al tipo de señalización, se sabe que el dominio Ig presente en NRG1typeI y typeII se une a heparina y a otros glicosaminoglicanos con elevado número de cargas negativas presentes en las matrices extracelulares. Este hecho unido a que además se ha encontrado expresión de estas NRG1 en la lámina basal de las sinapsis neuromusculares y durante el desarrollo embrionario en el endocardio pero no en el miocardio, explica por qué la señalización paracrina sería muy importante tanto para el desarrollo cardíaco como muscular (Goodearl *et al.*, 1995; Jo *et al.*, 1995; Li and Loeb, 2001).

El dominio EGF-like es necesario y suficiente para unir y activar a los receptores transmembrana de la familia ErbB y como se puede observar en la **Figura 6** puede ser de diferentes tipos:  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ , y además del tipo 1, 2, 3 o 4. En SNP sólo encontramos expresión de ErbB2 y ErbB3, y son los heterodímeros formados después de la interacción de las NRG1 con ErbB3 en las SC los que transmiten las señales provenientes del axón (Levi *et al.*, 1995; Yarden and Sliwkowski, 2001). Se sabe que una vez NRG1 se une a su receptor ErbB en la SC, la señalización se realiza mediante la activación de la vía PI3K/Akt. PI3K cataliza la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2) que a su vez recluta y activa, mediante fosforilación, la proteína Akt. Ésta, a su vez, activa la expresión de diferentes factores de transcripción implicados en mielinización como Oct6 y Egr2, y también la expresión de proteínas de la mielina como P0 (Taveggia *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006), además de influenciar la biosíntesis de colesterol por la activación del enzima HMG-Co-A (3-methylglutarylcoenzyme A) (Porstmann *et al.*, 2005; Quintes *et al.*, 2010).

La señalización NRG1/ErbB es muy importante tanto en el **desarrollo** de las células de la cresta neural como durante el proceso de la mielinización. Como se ha comentado anteriormente, es esencial que las células de la cresta neural migren y den lugar a los precursores de los diversos tipos neuronales y gliales del SNP. Se ha demostrado que el receptor ErbB3 se expresa en gran cantidad en las células de la cresta neural. Posteriormente su expresión se inhibe en la mayoría de estas células excepto en las SC, que mantienen su elevada expresión (Meyer *et al.*, 1997). Mutaciones en NRG1, ErbB2 o ErbB3 causan déficits en el desarrollo embrionario, concretamente altera la migración de las células de la cresta neural, pues no son capaces de moverse de la parte ventral del tubo neural. Se cree que la falta de la isoforma NRG1typeI, expresada por las células mesenquimales presentes a lo largo de la ruta migratoria, y NRG1typeIII, expresada en las neuronas periféricas que acompañan a las SC, serían las responsables del fallo en la migración (Britsch *et al.*, 1998).

En cuanto al papel de las NRG1s en la **mielinización**, el análisis de los mutantes específicos para las diferentes isoformas mostró que sólo NRG1typeIII era importante en todos los aspectos del proceso, tanto en el desarrollo de las SC mielinizantes, como en la migración, diferenciación y supervivencia de estas células (Michailov *et al.*, 2004; Taveggia *et al.*, 2005; Mirsky *et al.*, 2008). De hecho, la cantidad de NRG1typeIII presente en la superficie axonal determina el fenotipo de SC mielinizante o no y también la cantidad de mielina que tendrá el axón. Los axones no mielinizados de las neuronas autonómas presentan niveles bajos de NRG1typeIII mientras que las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal que están fuertemente mielinizadas presentan niveles elevados. Otras evidencias de la importancia de los niveles de expresión de NRG1typeIII en la mielinización las encontramos en los estudios en los ratones haplosuficientes para NRG1typeIII que muestran una elevada proporción de axones sin mielinizar; los ratones transgénicos que sobreexpresan NRG1typeIII presentan hipermielinización; y las neuronas de los ratones *knock-out*, que mueren antes de nacer, son incapaces de desarrollar mielinización alguna ni en presencia de SC de animales controles (French-Constant *et al.*, 2004). Además, la expresión ectópica de NRG1typeIII, así como la sobreexpresión mediante vectores virales de esta proteína, permiten la mielinización en fibras simpáticas postganglionares que normalmente no están mielinizadas (Taveggia *et al.*, 2005).

Recientemente se ha reportado que la señalización de la vía NRG1-ErbB se regula por la proteína Erbin. Esta proteína de la familia LAP, que contiene repeticiones ricas en leucinas (LRR) y un dominio PSD95-Dlg-Zo1 (PDZ) interacciona específicamente con ErbB2 para estabilizarlo y permitir una correcta señalización. Los ratones deficientes para Erbin o con mutaciones en el dominio PDZ muestran el mismo fenotipo: un menor grosor en la mielina que lleva a una disminución en la respuesta sensorial y una menor velocidad de conducción de nerviosa, debido al fallo en la señalización NRG1-ErbB (Tao *et al.*, 2009).

Como hemos comentado anteriormente BACE1, también conocida como  $\beta$ -secretasa, es una proteasa transmembrana dependiente de aspártico, que

además de cortar NRG1, participa en el  $\beta$ -procesamiento de la proteína precursora amiloide, generando el péptido  $\beta$ -amiloide cuyos agregados se detectan en la primera fase de la enfermedad de Alzheimer (Hussain *et al.*, 1999; Sinha and Lieberburg, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000). El principal fenotipo observado en los mutantes para esta proteasa, expresada principalmente en neuronas, es la hipomielinización del SNP, fenotipo similar al observado en los heterocigotos con mutaciones en NRG1 o ErbB2 (Hu *et al.*, 2006). De hecho, estudios *in vitro* han mostrado que los mutantes de BACE1 presentan una acumulación de NRG1 sin procesar que se proteoliza al añadir el enzima en forma recombinante. Estos resultados tienen especial relevancia a nivel farmacológico ya que la inhibición de este enzima se había considerado como una posible terapia para la enfermedad de Alzheimer (Willem *et al.*, 2006).

En relación al **procesamiento** de NRG1 se ha descrito que nardilisina (NRDc), una peptidasa perteneciente a la familia M16 y que selectivamente actúa sobre residuos dibásicos, regula también el proceso de mielinización, ya que promueve la activación de NRG1<sup>typeIII</sup> mediante la acción de BACE1. El análisis en los ratones deficientes para NRDc mostraron el mismo fenotipo que los ratones *knock-out* para BACE1 y heterocigotos para NRG1: una hipomielinización importante en SNP, y en los transgénicos una ganancia en el grosor de la mielina (Ohno *et al.*, 2009).

En **SNC** también se ha estudiado a fondo el papel de NRG1 tanto en **migración** como en la **mielinización**. Ya hemos tratado al principio de este capítulo la importancia en la migración de las células de la cresta neural para la correcta formación de toda la progenie neuronal y glial. En SNC es necesario que exista un balance muy estrecho entre las neuronas inhibitorias ya que alteraciones en este balance pueden desembocar en desórdenes neurológicos. Recientemente, se ha descrito que, particularmente, las neuronas inhibitorias del córtex necesitan la señalización vía NRG1 para su correcta migración y que estas neuronas expresan el receptor ErbB4, específico de SNC. Experimentos con cultivos celulares demuestran que NRG1 actúa como un factor quimioatrayente para estas neuronas y el análisis en los mutantes para ErbB4

o NRG1 demuestran que las neuronas inhibitorias se encuentran en número muy reducido en el córtex de estos animales (Flames *et al.*, 2004). Además de estar implicada en migración, la expresión de NRG1 en el córtex controla la formación de las proyecciones tálamocorticales, puesto que en ausencia de NRG1 estas proyecciones no se forman correctamente (Lopez-Bendito *et al.*, 2006).

En relación a otras funciones implicadas en **migración**, se conoce que en el cerebro murino adulto existen neuronas que continuamente son generadas e integradas dentro de los circuitos existentes que han cesado su desarrollo. La neurogénesis adulta ocurre principalmente en hipocampo y en el bulbo olfatorio. Las “stem cells” que generarán las nuevas neuronas adultas están localizadas principalmente en la zona subventricular de los ventrículos laterales y tienen que migrar hasta el bulbo olfatorio. Estas células se conocen como el grupo migratorio rostral y generan principalmente las neuronas inhibitorias del bulbo olfatorio. Los mutantes para ErbB4, además de presentar defectos en la migración durante el desarrollo, exhiben problemas en la distribución y diferenciación de las neuronas inhibitorias del bulbo olfatorio, implicando la activación del receptor como parte esencial en este proceso (Anton *et al.*, 2004).

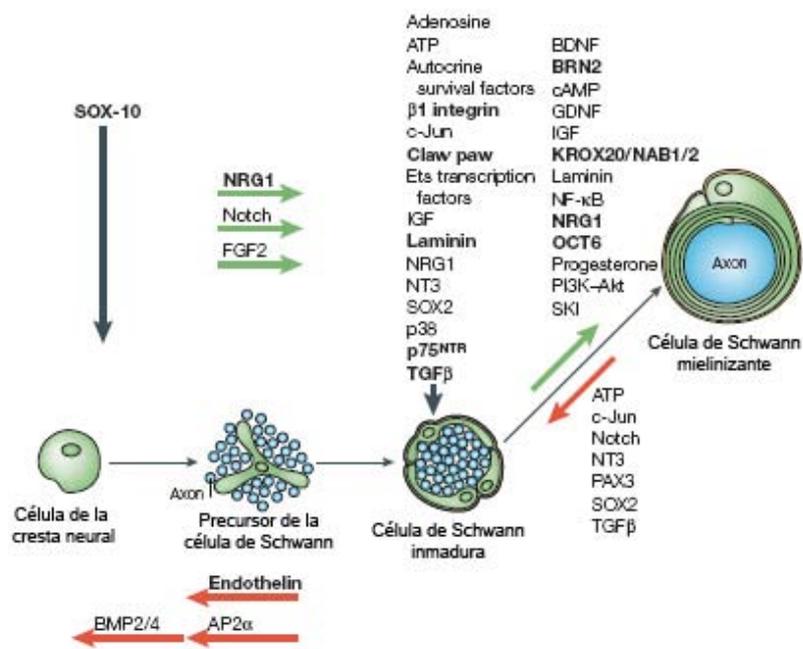
En cuanto al proceso de **mielinización**, se ha demostrado por diferentes estudios que NRG1 sólo afecta la mielinización en algunas áreas de SNC y que el control axonal de la mielinización mediado por los oligodendrocitos no tiene requerimientos específicos ni de NRG1<sup>typeIII</sup> ni del receptor ErbB para controlar el grosor de la mielina, a diferencia de lo que ocurre en SNP (Schmucker *et al.*, 2003; Sussman *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2007; Brinkmann *et al.*, 2008; Taveggia *et al.*, 2008).

Finalmente, en referencia a otras **patologías** donde está implicada la vía NRG1-ErbB, en los últimos años se han publicado muchos trabajos donde se relacionan haplotipos particulares de NRG1 y ErbB4 con el desarrollo de la esquizofrenia (Stefansson *et al.*, 2002; Harrison and Law, 2006; Law *et al.*, 2006). En estos estudios se relaciona una predisposición genética con el

desarrollo de la esquizofrenia, sin embargo aún no está claro cómo el desarrollo de la enfermedad está ligado a una pérdida o ganancia en la señalización NRG1-ErbB o ambas. Lo que sí parece demostrado es la importancia de la vía NRG1-ErbB4 controlando la despolarización inducida por la liberación del neurotransmisor GABA y la implicación en la maduración y plasticidad de las sinapsis glutamatérgicas (Liu *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2005; Bjarnadottir *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Además relacionados con estos resultados se han reportado algunos cambios de comportamiento en modelos murinos mutantes para NRG1 (Stefansson *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2008).

### 1.3.2. Factores de transcripción implicados en mielinización

La señalización que promueve la mielinización en SNP, además de NRG1, necesita de otros factores que conduzcan la transición de SC inmaduras a mielinizantes. Un elevado número de circuitos reguladores están implicados en este proceso poniendo de manifiesto la importancia de los principales factores de transcripción, entre ellos los promielinizantes Oct6 (SCIP), Brn2, Egr2 (Krox20) y Sox10, y c-Jun y Sox2 que controlan la desmielinización (Ver **Figura 7**).



**Figura 7.** Representación de los principales factores de transcripción implicados en mielinización. Adaptación de (Jessen and Mirsky, 2005)

**Oct6** y **Brn2** son factores de transcripción con un homeodominio POU y son dos de los reguladores autónomos de la mielinización presentes en las SC. Ambos factores de transcripción presentan un pico de expresión en el estado promielinizante, en el nacimiento, o bien en regeneración, y se ha observado que mientras en los nervios de ratones controles la mayoría de las SC competentes para mielinización se forman durante la primera semana postnatal, los mutantes para estas dos proteínas presentan una cinética de mielinización retrasada y su delección desemboca en un fenotipo severo de hipomielinización donde las SC no se diferencian ni mielinizan. Además se conoce que la principal diana de estos factores es *Egr2* (Bermingham *et al.*, 1996; Jaegle *et al.*, 1996; Jaegle *et al.*, 2003).

**Egr2** es un factor de transcripción que contiene tres dominios de unión a DNA “finger zinc” muy conservados. Su función se descubrió en los ratones *knock-out* para este gen, animales que morían antes de nacer y presentaban perturbaciones en el proceso de mielinización del SNP. La diferenciación de las SC estaba bloqueada y por tanto la consiguiente mielinización, de hecho no había signos de formación de la mielina compacta (LeBlanc *et al.*, 2007). Además los estudios en los ratones hipomórficos para *Egr2* también confirmaban esta función (Le *et al.*, 2005a). La inducción de este factor de transcripción durante la mielinización, a partir del día embrionario 15,5 y manteniéndose a lo largo de la vida adulta, coincide con la de las principales proteínas de la mielina, además el análisis de los ratones deficientes y la administración ectópica de *Egr2* en SC primarias han mostrado que este factor de transcripción está actuando sobre los niveles de expresión de las proteínas de la mielina (Topilko *et al.*, 1994; Nagarajan *et al.*, 2001; LeBlanc *et al.*, 2007). En humanos también se ha visto que mutaciones en el gen que codifica para este factor de transcripción dan lugar al desarrollo de neuropatías hereditarias como CMT1, CHN o DSS, confirmando su papel en la mielinización (Warner *et al.*, 1998; Warner *et al.*, 1999; Pareyson *et al.*, 2000).

Adicionalmente a estos factores encontramos a **Sox10**. Este miembro de la familia Sox se expresa durante todo el desarrollo de las SC y es esencial

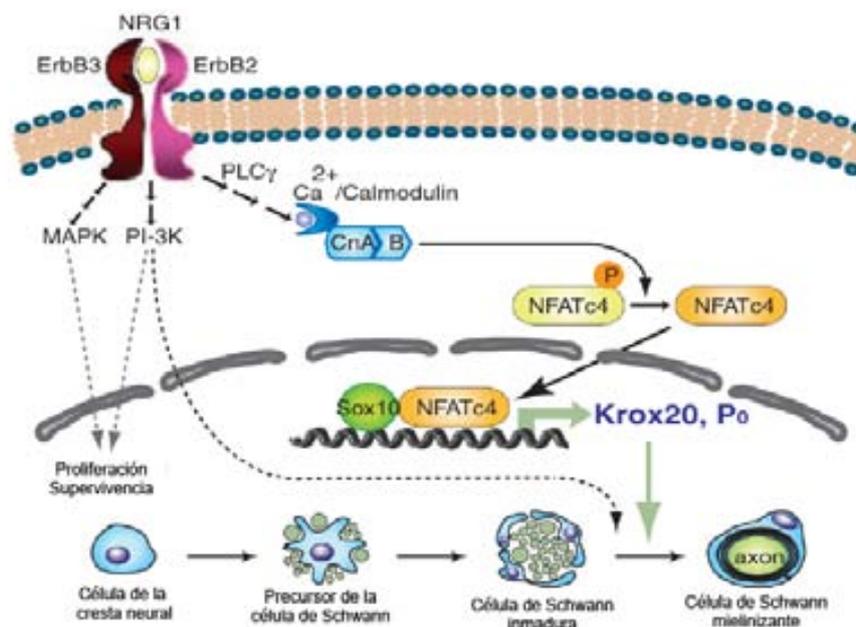
para la diferenciación de las SC inmaduras desde las células de la cresta neural, como se ha observado en los ratones mutantes para esta proteína (Britsch *et al.*, 2001). También se han encontrado mutaciones en pacientes con la enfermedad de Waardengerg-Hirschprung, con problemas de mielinización y a partir de los cuales se ha ligado su expresión con la de los genes de la mielina. En el adulto, Sox10 se expresa tanto en oligodendrocitos como en SC mielinizantes (Peirano *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2004).

El estudio de animales *knock-out* para Egr2 ha permitido conocer qué genes estaban controlados por este factor de transcripción y no sólo se han encontrado los genes de las principales proteínas de la mielina como P0, MBP, PMP22, Cx32 y MAG sino también genes implicados en la biosíntesis lípídica necesaria también durante la formación de la mielina como la HMG CoA reductasa (Leblanc *et al.*, 2005). La mayoría de estos genes además de ser regulados por Egr2, también tienen dianas de unión para Sox10 (Bondurand *et al.*, 2001; Taveggia *et al.*, 2004; Denarier *et al.*, 2005; LeBlanc *et al.*, 2006).

Además de estar regulados entre ellos, los diferentes factores de transcripción presentan otros estímulos que actúan sobre su expresión. **Nab1** y **Nab2** son dos proteínas implicadas en la regulación de la expresión de Egr2. El mecanismo de acción de estas proteínas pasa por la unión a uno de los dominios de Egr2. Así, la formación de los complejos Egr2 con Nab1 y Nab2 juegan un papel muy importante en la regulación *in vivo* de los genes diana, entre ellos los mielinizantes (Svaren *et al.*, 1996; Svaren *et al.*, 1998). En cultivos, Egr2 estimula la expresión de esas proteínas y la primera idea que se sugirió era que su expresión serviría de feedback negativo para el factor de transcripción, pero en los ratones dobles *knock-out* para las proteínas Nab se observó un fenotipo muy similar al deficiente en Egr2, los ratones morían por neuropatía periférica ya que la mielinización no se podía llevar a cabo y en caso de un papel inhibitor se tendría que haber observado una ganancia en la expresión de los genes de la mielina (Le *et al.*, 2005b; Srinivasan *et al.*, 2007). Se obtuvieron resultados similares en un modelo *knock-in* para las proteínas Nab, con una alelo resistente a la unión de Egr2, indicando que las proteínas

Nab no juegan un papel negativo en la expresión de Egr2 e incluso podrían actuar como coactivadores en ciertos contextos (Desmazieres *et al.*, 2008).

Por otra parte, un estudio reciente ha demostrado que es necesaria la señalización vía calcineurina/NFAT para que la mielinización activada por NRG1/ErbB vía Egr2 se realice correctamente. En este trabajo muestran que la activación de la vía de NRG1/ErbB estimula la defosforilación de NFATc4 por calcineurina y promueve su activación. NFATc4, tras su activación, es translocado a núcleo y, sinérgicamente con Sox10, activa Egr2 y también la expresión de la principal proteína de la mielina, P0 (Ver **Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema que muestra la activación de la mielinización vía la señalización por NRG1/ErbB y calcineurina/NFAT. Adaptación de (Kao *et al.*, 2009).

También se sabe que la activación de la proteína quinasa A (PKA) es un estímulo para activar Oct6 y a su vez aumentar la expresión de los genes implicados en mielinización. La inhibición de PKA reduce la mielinización en cocultivos de neuronas de ganglios de la raíz dorsal con SC primarias (Howe and McCarthy, 2000). Una de las moléculas activadas en la cascada de la PKA es el factor de transcripción NFκB, involucrado en proliferación y diferenciación en diferentes tipos celulares, y se han obtenido resultados sobre su

requerimiento en las SC para la activación de la mielinización (Nickols *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2008). El mecanismo que no se ha podido explicar es la rápida disminución en la expresión de Oct6 cuando Egr2 empieza a expresarse. No se conoce si es una autorregulación de la propia proteína o, lo más probable, que el propio Egr2 estimule un *feedback* negativo y sea el responsable de la disminución en la expresión del factor de transcripción POU, ya que también se han encontrado regiones de unión para Egr2 en el promotor de Oct6 (Ryu *et al.*, 2007).

## **2. DIABETES MELLITUS**

La *diabetes mellitus* (DM) es un trastorno multifactorial y multisistémico que tiene como característica principal el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), resultado de una defectuosa secreción de insulina, en su acción, o ambos. La insulina es una hormona polipeptídica producida y segregada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, en forma de precursor inactivo llamado proinsulina. Ésta pasa al aparato de Golgi, donde se modifica, eliminando una parte y uniendo los dos fragmentos restantes mediante puentes disulfuro. La insulina permite la entrada de la glucosa presente en sangre después de una ingesta a las células de diferentes tejidos, principalmente hígado y músculo. Se trata de una enfermedad compleja que incluye varias patologías en las cuales coexiste un trastorno global del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas. Es una de las enfermedades con más prevalencia en la población adulta y con una previsión de aumento en los próximos años en los países desarrollados.

Hay dos tipos principales de la diabetes: diabetes tipo I y tipo II. Al tipo I, también se le llama diabetes juvenil porque normalmente empieza durante la infancia aunque a veces también puede ocurrir en adultos. Viene dada por la destrucción de las células beta, debido a procesos autoinmunes o idiopáticos. El cuerpo no produce la hormona, por tanto, las personas con diabetes tipo I dependen de la administración de insulina para sobrevivir. Menos del 10% de los afectados por la diabetes padecen el tipo I. El proceso de desarrollo de la

diabetes es gradual, se puede dividir en cinco etapas: predisposición genética, desencadenador ambiental, autoinmunidad activa, destrucción progresiva de las células beta, finalizando en la presentación de los síntomas propios de la enfermedad. Se han realizado estudios en los que se han demostrado cambios incluso una década antes de que se presenten los síntomas reales de diabetes (Beck *et al.*, 2009).

Las personas con diabetes tipo I suelen tener una predisposición genética a la enfermedad, aunque se requieren uno o más sucesos o incidentes ambientales para desencadenar la enfermedad según los muchos estudios realizados en familias afectadas por diabetes (Ikegami *et al.*, 2006; Erlich *et al.*, 2009a; Howson *et al.*, 2009). Diferentes artículos demuestran que uno de los disparadores ambientales durante el desarrollo de la diabetes tipo I sería el virus Coxsackie B. Este virus presenta una proteína en la cápside con una alta homología al enzima glutámico descarboxilasa (GAD) presente en la superficie de las células beta. Así la respuesta inmune continuaría atacando las células pancreáticas después de defenderse del virus, desarrollando autoinmunidad (Dotta *et al.*, 2007; van der Werf *et al.*, 2007; Foulis, 2008). Además de la respuesta inmune contra GAD, también se han descrito autoanticuerpos contra la fosfatasa presente en el interior de las células beta o incluso contra la propia insulina (Jahromi and Eisenbarth, 2007; Baschal and Eisenbarth, 2008; Dib and Gomes, 2009).

Además de hiperglucemia, los pacientes presentan como sintomatología más característica, polifagia, poliuria, pérdida de peso, fatiga, visión borrosa y azúcar y cetonas en la orina.

La diabetes tipo II se caracteriza por un complejo mecanismo fisiopatológico cuyo rasgo principal es el déficit relativo de producción de insulina y una deficiente utilización periférica por los tejidos y como consecuencia la hormona no puede facilitar la entrada de la glucosa al interior de las células. Se desarrolla a menudo en etapas adultas de la vida y es muy frecuente su asociación con la obesidad, aunque también puede presentarse en personas delgadas, especialmente en ancianos. La etiología genética, un

bajo nivel de actividad, una dieta deficiente y el elevado peso corporal aumentan significativamente el riesgo de desarrollar este tipo de diabetes (Cooper *et al.*, 2009; Talmud *et al.*, 2010).

Independientemente del tipo de DM, y a pesar del tratamiento con insulina, niveles de glucosa en sangre alterados conducen a diferentes complicaciones: 1) Daño de nervios periféricos (neuropatía), 2) Afectaciones en pequeños vasos sanguíneos (microangiopatía), 3) Síndrome del pie diabético: heridas difícilmente curables debidas a la mala irrigación sanguínea y a la degeneración de los nervios de los pies que pueden conducir a laceraciones y eventualmente a la amputación de las extremidades inferiores, 4) Daño de la retina (retinopatía), 5) Afectación renal (nefropatía), 6) Hígado graso o hepatitis de hígado graso (adipohepatía) y 7) Daño de los vasos sanguíneos grandes (macroangiopatía), trastorno de las grandes venas.

### **2.1. NEUROPATÍA DIABÉTICA**

La neuropatía diabética (ND) es una de las complicaciones más comunes de la DM, en la cual se presenta daño en los nervios tanto periféricos como somáticos y autónomos, resultado de la hiperglucemia/hipoinsulinemia. Se estima que la prevalencia de la neuropatía clínicamente significativa es cercana al 60%, sin embargo se pueden demostrar alteraciones electrofisiológicas en casi el 100% de los diabéticos, aunque en muchos la complicación sea subclínica (Aguilar-Rebolledo, 2005). Existen evidencias de que la hiperglucemia crónica y las alteraciones metabólicas relacionadas intervienen en la patogenia de las anomalías en la fibra nerviosa y en la microvasculatura que causan la neuropatía.

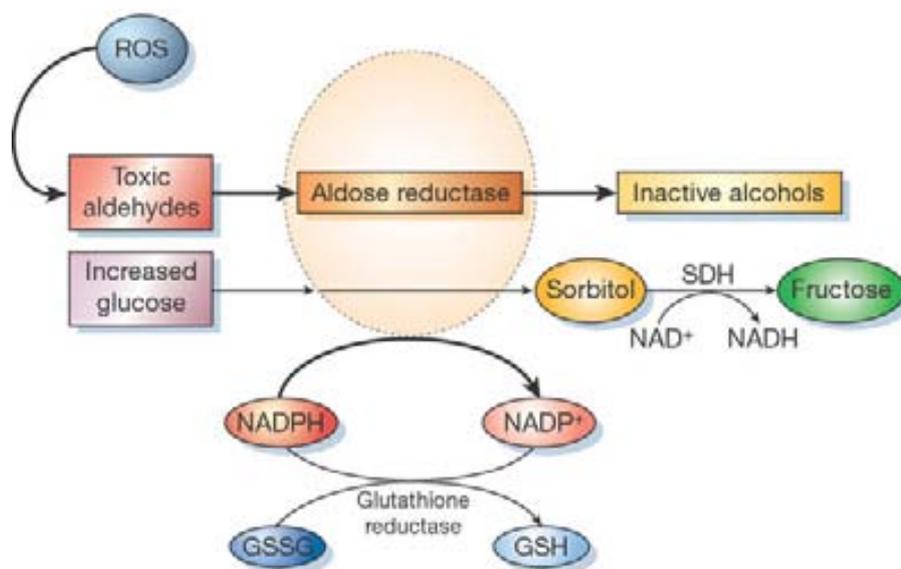
Desde el punto de vista patológico la afectación de la fibra nerviosa se distingue por degeneración progresiva e impedimento regenerativo de las fibras nerviosas periféricas. Estos cambios están vinculados al deterioro de la función nerviosa con disfunción sensorial de las extremidades y con dolor. En un principio, hay un dolor y hormigueo intermitente en las extremidades, inicialmente en los pies, mientras que en las etapas más avanzadas, el dolor

es más intenso y constante. En este tipo de dolor, con una incidencia del 16-26% en las personas con diabetes, generalmente las primeras fibras afectadas son las C, pero a medida que la sintomatología avanza va afectando a las fibras A (*beta* y *delta*). El dolor neuropático puede llegar a provocar una fatiga constante, depresión e incluso una fuerte ansiedad que afecta seriamente la calidad de vida de los pacientes. Finalmente, se desarrolla una neuropatía sin dolor. Cuando se pierde la sensación al dolor en el área, incrementa en alto grado el riesgo de una lesión severa en los tejidos, dado que el dolor ya no alerta al paciente sobre dichas lesiones. Estos síntomas varían dependiendo del nervio o nervios afectados y pueden ser distintos a los antes enumerados. Los síntomas suelen desarrollarse de forma gradual con los años.

Para el diagnóstico de la complicación generalmente se realizan tests a nivel de las extremidades donde se analizan los reflejos, la capacidad de respuesta a temperatura y la vibración de los pacientes. En algunos casos también se pueden llegar a realizar tests neurológicos e incluso biopsias de piel (Devigili *et al.*, 2008; Panoutsopoulou *et al.*, 2009).

Los mecanismos patogénicos que llevan al desarrollo de la ND todavía no son claros, probablemente la causa de la ND es diferente según el tipo de complicación. Se acepta que la patogenia de esta enfermedad es consecuencia de diversos factores y se postulan diferentes teorías que pretenden explicar las causas más probables de las lesiones nerviosas. Entre ellas tenemos la activación de la vía del poliol que se da en condiciones de hiperglucemia, ya que el enzima hexoquinasa que se encarga de transformar la glucosa en glucosa-6-fosfato está saturado en diabetes y la aldosa reductasa (AR) sólo se activa a concentraciones elevadas debido a su baja afinidad por el sustrato. El enzima AR se expresa en grandes cantidades en las SC, cataliza la reducción de glucosa a sorbitol utilizando el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Los niveles elevados niveles de sorbitol acumulados en las células nerviosas provocan daño celular y tisular (Takeshi S, 1999). Adicionalmente, una excesiva concentración de sorbitol provoca una disminución en el mio-inositol que lleva a la alteración de la actividad  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ , esencial para la conducción nerviosa. Como resultado de la

sobreutilización de NADPH, se produce un déficit homeostático por parte de otros enzimas que utilizan el mismo coenzima que desencadena una disminución en los niveles de óxido nítrico y glutatión reducido que a su vez resulta en un incremento del estrés oxidativo, desencadenando daños en las células endoteliales (Oka and Kato, 2001) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Esquema de la vía de metabolización de la glucosa mediante el enzima aldosa reductasa. Esquema de flipper.diff.org.

La célula produce especies ROS (*reactive oxygen species*) durante un flujo metabólico normal, vía la cadena de transporte de electrones mitocondrial y éstos son detoxificados por enzimas como el glutatión, la catalasa y la superóxido dismutasa. En condiciones hiperglucémicas la célula metaboliza más glucosa generando más radicales libres y acumulando ROS que acabarían alterando el potencial de membrana mitocondrial y comprometiendo las funciones celulares sobretodo en las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (Leininger *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2007). En estas condiciones tendríamos activación del enzima nuclear poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) que también se ha descrito por su importante papel en la muerte celular y en el desarrollo de la complicación (Obrosova *et al.*, 2005a; Pacher and Szabo, 2005), (Garcia Soriano *et al.*, 2001; Obrosova *et al.*, 2004; Pacher *et al.*, 2005; Szabo, 2005).

Otro mecanismo que podría participar en la patogenia de la ND sería la activación de la proteína quinasa C (PKC). Se conoce que la hiperglucemia y la alteración en las concentraciones de iones calcio aumentan los niveles intracelulares de diacilglicerol (DAG), cofactor que activa diferentes isoformas de la PKC, produciendo hiperalgesia en los modelos murinos de ND (Ohsawa and Kamei, 1999; Shangguan *et al.*, 2003; Yamagishi *et al.*, 2003; Uehara *et al.*, 2004; Sluka and Audette, 2006).

Otra consecuencia importante de la hiperglucemia e involucrada también en la ND es la glicosilación no enzimática de proteínas con moléculas de glucosa formando productos muy estables llamados AGEs (*Advanced glycation end products*). Estos productos señalizan vía sus receptores, llamados RAGE, llegando a causar daño celular ya que modifican proteínas intracelulares involucradas en transcripción genética, causan disfunción celular interaccionando con proteínas de la matriz extracelular, además de alterar la producción de citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento (Toth *et al.*, 2007; Huijberts *et al.*, 2008; Lukic *et al.*, 2008; Sugimoto *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2008).

En muchos de los estudios referidos anteriormente, las neuronas se presentan como el tipo celular principalmente afectado por la hiperglucemia y por los ácidos grasos en el caso de diabetes tipo II, pero también existen otros estudios que indican que la supervivencia de las células gliales jugaría un papel importante en el desarrollo de la complicación (Eckersley, 2002; Sango *et al.*, 2002; Hill, 2009). Por otra parte, las alteraciones en la expresión de factores neurotróficos podrían estar implicadas en la patogenia del desarrollo de la ND. Las neuronas y las células gliales requieren factores tróficos que se pueden definir como proteínas solubles endógenas que regulan la supervivencia, el crecimiento, la plasticidad morfológica y la síntesis de proteínas que permiten las diferentes funciones neuronales. Estas moléculas son necesarias tanto en el desarrollo embrionario como en etapas adultas. Además, son importantes en procesos de regeneración de las neuronas dañadas por sección, traumatismo o agentes químicos.

Una de las moléculas que ha demostrado tener un efecto neurotrófico importante es CNTF (factor neurotrófico ciliar) que se expresa en las células gliales de SNC y SNP y que tiene una importante función en la supervivencia celular y en la diferenciación de neuronas sensoriales y motoras (Sleeman *et al.*, 2000) y existen evidencias de su papel en el mantenimiento de las neuronas adultas, ya que el ratón *knock-out* para CNTF muestra una estructura axonal anormal (Gatzinsky KP, 2003).

Después de 1-2 meses de hiperglucemia la expresión de CNTF se reduce (Calcutt NA, 1992; Tomlinson, 1992). De hecho, la administración exógena de CNTF en forma de proteína recombinante en ratas diabéticas mejora la velocidad de la conducción nerviosa y la regeneración (Calcutt NA, 2004). Los resultados mejoran con ensayos de terapia génica utilizando virus ya que permitían una expresión a más largo plazo que con la proteína recombinante (Harvey AR, 2006).

También es importante el papel que desarrolla el sistema IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), que consta de IGF-I, IGF-II, insulina, IGF-I-R y las proteínas de unión a IGF en la ND. Su función en el crecimiento, desarrollo, metabolismo y supervivencia de muchos tejidos y órganos es imprescindible. En SN, regula la supervivencia tanto en neuronas como en SC y la diferenciación neuronal (Feldman *et al.*, 1997; Morrione *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002), promueve la regeneración en cultivos de neuronas sensoriales (Ferryhough *et al.*, 1993), estimulando el crecimiento neurítico (Kim *et al.*, 1997; Rind and von Bartheld, 2002), también promueve el desarrollo de los oligodendrocitos (Dubois-Dalcq and Murray, 2000; Jiang *et al.*, 2001), y estimula la mielinización de SNC (Copelman *et al.*, 2000) y SNP (Cheng *et al.*, 1999). También se ha encontrado disminuida su expresión en cultivos hiperglucémicos de neuronas sensoriales (Giannini *et al.*, 2008), en animales diabéticos (Jianbo *et al.*, 2002), y en pacientes con diabetes tipo I (Capoluongo *et al.*, 2006), relacionando sus niveles con el desarrollo de la ND.

Otro factor trófico que parece estar implicado en la ND es NGF (factor de crecimiento nervioso). Esta pequeña proteína secretable es muy importante para la supervivencia y mantenimiento de neuronas sensoriales y simpáticas (Freeman *et al.*, 2004). Los niveles de expresión de esta proteína son críticos, pues la disminución de la secreción por las SCs en condiciones de hiperglicemia provoca defectos en la regeneración axonal (Tosaki *et al.*, 2008), (Pittenger and Vinik, 2003). También se ha descrito que la sobreexpresión de NGF aumenta la expresión de mediadores de nocicepción como sustancia P y CGRP (*calcitonina gene-related peptide*) en neuronas sensoriales, provocando alodinia en estos ratones (Cheng *et al.*, 2009).

Aunque menos estudiados que NGF, también se ha encontrado alteración de otros factores neurotróficos en ratones diabéticos como BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), NT-3 (neurotrofina 3) o GDNF (factor neurotrófico derivado de la glia) (Anand, 2004).

La expresión de BDNF está aumentada después de una lesión en nervio ciático y en ratas diabéticas (Mizisin *et al.*, 1997), también en nervios de pacientes diabéticos con patología axonal (Sobue *et al.*, 1998). El sistema NT-3/TrkC se encuentra también alterado en neuropatías periféricas, de hecho se ha reportado disminución en la expresión tanto de la NT-3 como de su receptor, en ratas diabéticas (FERNYHOUGH *et al.*, 1998). Debido a que NGF, BDNF y NT-3 median la respuesta trófica en subpoblaciones de neuronas periféricas separadamente, sería posible que la regulación estuviera condicionada de igual manera según el total neuronal de cada subpoblación.

Además, la expresión de GDNF ha sido caracterizada en ratones y pacientes con neuropatía diabética y su expresión se ha relacionado directamente con los niveles de la patología (Yamamoto *et al.*, 1998; Hoke *et al.*, 2002).

### 2.1.1. Tratamiento

Debido a la gran variedad de factores causales y contribuyentes en la patogenia y a toda la sintomatología presente en la ND, no existe un tratamiento único satisfactorio. Se cree que el control de los niveles de glucosa y de insulina es la parte fundamental del esquema terapéutico, aunque no es suficiente pues los pacientes, tratados con insulina, finalmente desarrollan las complicaciones. Además los pacientes diabéticos que han recibido transplante de páncreas igualmente acaban desarrollando complicaciones como la ND sugiriendo que es muy importante realizar el tratamiento de las complicaciones al inicio de la enfermedad (Navarro *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 1997). Para ello es necesario conocer las causas fisiopatológicas que llevan a desencadenar esta complicación de la DM.

En el aspecto farmacológico se han utilizado compuestos dirigidos a los mecanismos causales del desarrollo de la complicación. Los más utilizados hasta la actualidad son los inhibidores de la aldosa reductasa (ARIs) (Demiot *et al.*, 2006; Hotta *et al.*, 2006). Estos inhibidores mejoran la activación y la apoptosis glial además del estrés oxidativo presente en la ND (Drel *et al.*, 2008), el déficit en la expresión de factores neurotróficos que se da en los modelos murinos (Cunha *et al.*, 2008; Shimoshige *et al.*, 2010), además de mejorar el tamaño y la densidad de las fibras nerviosas que se desarrolla durante la diabetes y la velocidad de conducción motora, con rangos de mejora sobre el 10% (Matsumoto *et al.*, 2008). Los ensayos clínicos en pacientes con estos inhibidores, parecen tener un efecto beneficioso en cuanto a la percepción subjetiva de la complicación por parte de los pacientes, aunque realmente las mejoras a nivel de conductividad motora y sensorial son leves, no superiores al 5% (Kawai *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2009).

Como se ha explicado anteriormente uno de los síntomas que más afecta a la calidad de vida de los pacientes con ND es el dolor neuropático, por tanto muchos de los estudios van encaminados a encontrar un tratamiento para el dolor. Se han utilizado diferentes tipos de analgésicos en ensayos clínicos, siendo la licosamida, medicamento que disminuye la activación de los canales

de sodio, el que ha dado mejores resultados con una reducción significativa del 30% del dolor en algunos de los pacientes, (Doty *et al.*, 2007; Shaibani *et al.*, 2009; Wymer *et al.*, 2009). Desgraciadamente estos tratamientos son solamente útiles para algunos pacientes, y cada vez se tienen más evidencias que éste tiene que ser completamente personalizado y según la sintomatología del paciente el analgesico debe ser diferente (Jensen *et al.*, 2009; Kroenke *et al.*, 2009; O'Connor and Dworkin, 2009). La estimulación eléctrica nerviosa transcutánea también se ha utilizado para paliar el dolor neuropático, pero sin observarse ningún beneficio significativo para los pacientes (Moharic and Burger, 2009; Binder and Baron, 2010; Dubinsky and Miyasaki, 2010; Swislocki *et al.*, 2010).

En modelos murinos se ha testado el efecto de diferentes moléculas antioxidantes como el ácido lipoico (Cameron *et al.*, 2001a; Varkonyi and Kempler, 2008), la dimetiltiourea (Cameron *et al.*, 2001b), allopurinol y taurina (Li *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2007), observándose una mejoría sobre el 10%, aunque sólo en la hiperalgesia mecánica.

El uso de inhibidores de PARP (Illynska *et al.*, 2006; Stevens *et al.*, 2007; Obrosova *et al.*, 2008; Pacher, 2008; Sharma *et al.*, 2008) y de algunas isoformas de la PKC (Joy *et al.*, 2005; Honda *et al.*, 2007; Danis and Sheetz, 2009) también han demostrado reducir ligeramente, sobre un 10-15%, la hiperalgesia termal y mejorar la pérdida de fibras nerviosas que se produce durante la ND.

La utilización de terapias con factores neurotróficos también se ha reportado como tratamiento para la ND. Así por ejemplo la administración de GDNF en modelos murinos mejora las funciones neuronales y restaura parte del déficit neurotrófico (Akkina *et al.*, 2001; Anitha *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009a). Otro de los factores tróficos utilizado es CNTF, su administración mejora la conducción nerviosa así como el déficit en la regeneración durante la diabetes, en un rango del 10-15% (Calcutt NA, 2004; Mizisin *et al.*, 2004). La

administración de IGF-I también ha mostrado efectos positivos, sobre un 10% en la hiperalgesia y también en la conducción nerviosa (Thraillkill, 2000; Mohamed-Ali and Pinkney, 2002; Brussee *et al.*, 2004; Chu *et al.*, 2008; Homs, 2010). También se ha utilizado NGF como posible tratamiento, donde se describió que mediaba una disminución en la nocicepción en ratones pero finalmente los ensayos clínicos casi no mostraron beneficios en pacientes (Apfel, 2002; Christianson *et al.*, 2003b; Walwyn *et al.*, 2006).

Otras de las moléculas utilizadas para el tratamiento de la ND son la interleuquina-6 (Il-6) y el péptido C. La Il-6 es un miembro de la familia de citoquinas neuropoyéticas y está descrito que tiene una multifuncionalidad biológica tanto regulando las diferentes fases de la respuesta inmune como en el desarrollo neuronal y como factor neurotrófico. La administración de la citoquina Il-6 en ratas diabéticas ha mostrado tener efectos beneficiosos en la disfunción nerviosa como en la nocicepción (Andriambelason *et al.*, 2006; Cameron and Cotter, 2007).

También está descrito el efecto insulinomimético que ejerce el péptido C, que igual que la insulina no está presente en los pacientes con diabetes tipo I. Aunque el péptido C no tiene un efecto inmediato en la hiperglucemia, sí que participa en la señalización de la vía de la insulina, inhibiéndola a elevadas concentraciones y actuando sinérgicamente a bajas concentraciones. Además, diferentes estudios han mostrado que estimula la expresión de NGF, IGF-I y sus receptores (Sima, 2004; Sima *et al.*, 2004; Kamiya *et al.*, 2005). La utilización del péptido C para el tratamiento de la ND, mejora los niveles de la conducción nerviosa (Ekberg *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Ekberg and Johansson, 2008; Sima and Kamiya, 2008).

### **3. TERAPIA GÉNICA**

La terapia génica consiste en la transferencia de material genético al núcleo de las células, para curar una enfermedad o para mejorar el estado

clínico del paciente mediante un conjunto de técnicas que permiten vehiculizar secuencias de DNA o de RNA al interior de las células diana para modular así la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas y poder revertir el trastorno biológico que provocan. Las enfermedades para las cuales se desarrollan protocolos de terapia génica suelen ser aquellas donde la farmacoterapia convencional resulta poco eficaz. Existen pocas enfermedades de origen genético en las cuales sea factible suministrar la proteína deficitaria de forma farmacéuticamente efectiva debido a su naturaleza lábil y compleja y a la necesidad de hacerla llegar a un dominio subcelular específico.

La terapia génica es una de las disciplinas de la biomedicina con aplicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades genéticas y no genéticas y para vacunación. Para el tratamiento de enfermedades genéticas o crónicas, se requiere la expresión del gen terapéutico durante gran parte de la vida del paciente y a un nivel que sea terapéutico para revertir el fenotipo de la enfermedad. Este hecho hace que sea imprescindible el desarrollo de vectores seguros que permitan la expresión del transgén durante largo plazo y que evite la respuesta inmune del paciente, punto imprescindible para que estos vectores puedan ser utilizados en protocolos de terapia génica *in vivo*.

Actualmente los vectores utilizados en terapia génica se dividen en dos grandes grupos, los **vectores virales** y los **no virales**.

La terapia génica viral consiste en la introducción de material genético mediante el uso de vectores víricos, éstos pueden presentar un tropismo diferente y específico para diferentes tipos celulares y eso permite una mayor eficiencia para transducir el órgano diana. Los vectores virales más utilizados actualmente en ensayos clínicos incluyen retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), lentivirus (HIV-1), vaccinia virus y herpes simplex virus (HSV). Así, dependiendo de la célula diana y de la necesidad de expresar el transgén de forma transitoria o permanente se puede utilizar un tipo de vector u otro. Hasta ahora la mayoría de ensayos clínicos que se están realizando son con vectores adenovirales aunque los vectores adenoasociados tienen cada

vez un papel más prometedor por la existencia de diferentes serotipos que amplían su tropismo, sin olvidar su menor respuesta inmunológica que les proporciona más estabilidad. De momento, ningún vector disponible satisface del todo los criterios de un sistema de terapia génica ideal (Romano, 2000).

Los lentivirus son virus de ssRNA que están clasificados dentro de la familia *Retroviridae*. Su replicación se realiza a través de la formación mediante retrotranscripción de un DNA provisional y luego insertado en el genoma de la célula huésped, por lo que dependen de enzimas transcriptasas inversas y de integrasas de la célula diana. Los lentivirus tienen la interesante propiedad de ser capaces de infectar células que estén en contacto con la que ocupan sin necesidad de formar partículas extracelulares (viriones), mediante la formación de sincitios con células sanas.

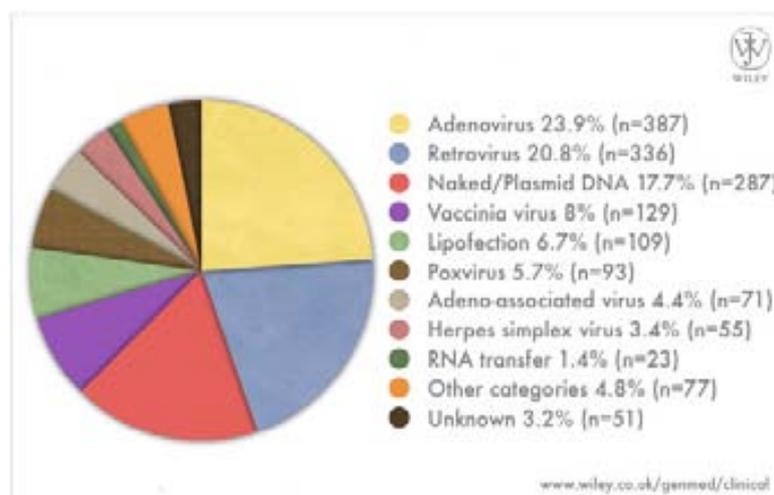
Los viriones contienen cuatro genes principales que codifican para las proteínas necesarias para la regulación y la replicación de la síntesis del DNA, y los extremos están flanqueados por LTR (*long terminal repeats*). Para su utilización como vectores virales los genes virales son delecionados y sustituidos por los genes terapéuticos. Se han utilizado ampliamente *in vitro*, pero no *in vivo*, básicamente porque no presentan una infección específica celular (Harper and Gonzalez-Alegre, 2008; Li and Rossi, 2008).

La terapia génica no viral se basa en la utilización de métodos físico-químicos para la introducción del gen terapéutico y se clasifican en lípidos o polímeros catiónicos. Estos vectores son de fácil generación y en cuanto a longitud del gen de interés no hay limitación. Para la utilización de los lípidos catiónicos, éstos se mezclan con el DNA formando lipoplexos. La eficiencia de transferencia de estos complejos está afectada por muchos factores como el tipo celular utilizado, la estructura y proporción del propio lípido y la cantidad total de lipoplexo utilizada para la transferencia (Gao *et al.*, 2007). Una de las principales problemáticas que presentan estos vectores es la alteración en la carga de las membranas celulares lo que puede llegar a generar agregaciones a nivel protéico y citotoxicidad (Li *et al.*, 1999). Se ha intentado solucionar este problema conjugando los lipoplexos con polietilenglicol (PEG) para reducir

estos problemas citotóxicos (Ambegia *et al.*, 2005), pero estudios recientes han mostrado que estos complejos con PEG inyectados repetidamente activan la respuesta inmune (Ishida *et al.*, 2006; Judge *et al.*, 2006). Los polímeros catiónicos utilizados se basan en poliplexos formados mediante la unión del DNA con polietilenimina (PEI). Sin embargo estos complejos también han mostrado tener citotoxicidad en ciertos casos (Fischer *et al.*, 2003).

Se están estudiando otras estrategias con vectores no virales como la utilización de péptidos que permitan la condensación del DNA. Estos complejos protegen al DNA de la actividad endonucleasa, hecho esencial para la llegada al núcleo y la expresión final del transgén. Los péptidos más utilizados son el core peptídico adenoviral Mu ( $\mu$ ) (Goparaju *et al.*, 2009), el péptido de la proteína transactivadora (Tat) del HIV (Rudolph *et al.*, 2003; Soundara Manickam *et al.*, 2005) y péptidos procedentes de las histonas (Baake *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 2002). La utilización de estos péptidos aún están en estudio y su eficiencia de transfección sigue siendo baja.

En los últimos años se han realizado diferentes ensayos clínicos en fase I, II y III, con diferentes vectores (Ver **Figura 10**).



**Figura 10.** Vectores usados en ensayos clínicos de terapia génica. Esquema de [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)

Los vectores adenovirales son los más utilizados en ensayos clínicos, principalmente para el tratamiento contra el cáncer. Se están realizando modificaciones en los genomas para proveer al vector de un tropismo específico para las células cancerígenas (Tang *et al.*, 2009; Gomez-Gutierrez *et al.*, 2010). Se han utilizado principalmente como terapia para diferentes tipos de tumores como los de cabeza y cuello, bucales, faríngeos y glioblastomas siendo ellos los propios quimioterápicos (Wilson, 2002; Relph *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2009), o siendo los portadores de genes supresores de tumores, genes suicidas, inmunoterápicos o moléculas antiangiogénicas que ayuden en la terapia antitumoral (Wang *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010; Peng and Jordan, 2010; Pickel *et al.*, 2010). Se realizaron diferentes ensayos con vectores retrovirales para inmunodeficiencias que tuvieron éxito, la mayoría de los pacientes mostró mejoras en la funcionalidad y el número de células B y T, pero posteriormente desarrollaron efectos severos. El reporte actual de uno de los ensayos para X-SCID es que después de la terapia, 5 de los 20 pacientes desarrollaron leucemias debido a la integración del transgén en el genoma de los pacientes se produjo próxima a protooncogenes, produciendo la muerte de uno de los pacientes (Rans and England, 2009). A partir de este suceso se realizaron muchos estudios sobre los posible “hot spots” para la integración de estos vectores (Cattoglio *et al.*, 2007; Moalic *et al.*, 2009), postulando los lentivirus como alternativa a los retrovirus humanos, y además hizo que los vectores con un índice de integración bajo adquirieran una relevancia más considerable debido a su mejor bioseguridad ya que se evita la mutagénesis insercional.

Sin embargo los vectores integrativos se han seguido utilizando para terapia génica celular. Recientemente se realizó un ensayo clínico con vectores lentivirales en pacientes con adrenoleucodistrofia donde las células autólogas CD34+ de los pacientes se corrigieron con los vectores codificando para la proteína ABCD1, gen donde se encuentran las mutaciones responsables del desarrollo de la enfermedad. Los resultados preliminares de esta terapia muestran la interrupción del progreso de la desmielinización presente en SNC de los pacientes tratados (Cartier *et al.*, 2009).

El éxito de la terapia génica en ensayos clínicos en humanos depende del desarrollo de vectores que se puedan producir a gran escala, que puedan ser administrados por una ruta no invasiva y que tengan la capacidad de transducir sólo las células deseadas en el tejido diana. Además, su inmunogenicidad tendría que ser baja y poseer una alta capacidad para introducir cDNA de secuencias suficientemente grandes y permitir expresar el transgén de forma terapéutica bajo una regulación controlada durante el periodo de tiempo deseado.

### 3.1. VECTORES ADENOASOCIADOS

Los virus adenoasociados son miembros de la familia *Parvoviridae*, del género *Dependovirus* y requieren de un helper virus como adenovirus o herpes simplex virus para su proliferación y replicación de los viriones.

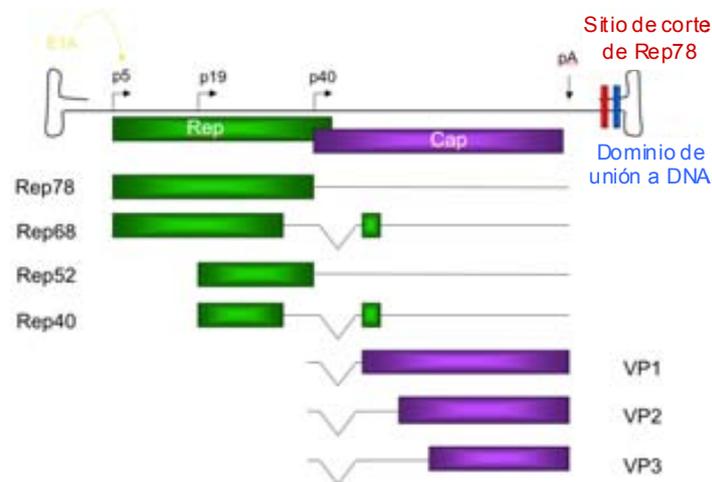
Los adenoasociados silvestres (*wt*) se integran en el genoma de la célula diana y establecen una infección latente en ausencia del helper virus. La integración en genoma de la célula huésped es específica, con una elevada frecuencia en el cromosoma 19 (19q13-qter). En los vectores recombinantes se elimina prácticamente esta capacidad de integración en la célula diana delecionando el gen Rep que codifica para la replicación.

Los vectores adenoasociados tienen la capacidad de infectar tanto células en división como quiescentes, hecho que hace que puedan ser utilizados ampliamente como vectores virales. El virión tiene un diámetro entre 18-26nm y un peso molecular de 5,5-6,2MDa. El genoma viral está formado por una cadena sencilla de DNA (ssDNA) de 4,7kb en la cual encontramos los *Inverted Terminal Repeats* (ITRs) en los extremos 5' y 3', secuencias ricas en dinucleótidos guanina-citosina que permite la formación de estructuras palindrómicas. Estos ITRs flanquean dos largas pautas de lectura (ORFs) que corresponden a los genes Rep y Cap y que equivalen al 90% del genoma viral.

Los ITRs, a ambos lados, tienen tres funciones principales: el extremo 3' sirve de encebador para la síntesis de la nueva cadena de DNA, es el sitio de

unión para las proteínas Rep78 y Rep68 (RBS, *Rep binding site*) donde se inicia la función de helicasas y endonucleasas y contienen la *Terminal Resolution Site* (TRS), secuencia idéntica a una región del cromosoma 19 que tiene la función de secuencia de integración del genoma viral (Wu Z, 2006).

El gen Rep codifica para cuatro proteínas (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40) que tienen un papel importante en muchos pasos del ciclo viral. Los mRNAs codifican para cuatro proteínas que se transcriben a partir de dos promotores, p5 y p19, el primero activa la transcripción de las proteínas Rep78 y Rep68. Son proteínas esenciales para la replicación del DNA viral, para el control de transcripción y del sitio de integración. El promotor p19 activa la transcripción de Rep52 y Rep40 cuya función es agrupar las cadenas sencillas del genoma para que sean encapsidadas posteriormente. El gen Cap codifica para tres proteínas de la cápside viral: VP1, VP2 y VP3 que se transcriben a partir de p40 (Ver **Figura 11**). Estas proteínas forman las 60 subunidades de las cápsides virales, presentando una simetría icosaédrica (Lu, 2004).



**Figura 11.** Genoma de un virus adenoasociado

Cuando se utilizan los virus adenoasociados como vectores, se deletan los genes Rep y Cap, que se sustituyen por el transgén de interés y sus secuencias reguladoras, las cuales se han de suministrar en *trans* junto a los genes de un adenovirus o herpes simplex virus durante la producción del vector viral. Como vectores de terapia génica tienen una limitación de tamaño,

ya que la longitud del transgén no puede exceder las 4,7kb que es la equivalente a la longitud del genoma *wt* (Maheshri N, 2006).

A pesar de su efectividad como vectores virales para terapia génica, los AAVs presentan un paso limitante en el proceso de infección de la célula diana, su genoma es de cadena sencilla (ssDNA). Por ese motivo se requiere de la maquinaria transcripcional celular para la síntesis de la cadena complementaria, una vez realizada la infección, por lo que las DNAsas de las células huésped pueden eliminar el DNA viral. Para solventar este punto, actualmente se están trabajando con una variante de vectores adenoasociados llamados sc-AAV (*self complementary*), que se encapsidan en forma de dímeros o de DNA de cadena doble (dsDNA) de manera que la efectividad de infección mejora ya que no tienen que sintetizar la cadena complementaria y así también se acelera el proceso de infección (Storek *et al.*, 2006; Hollis *et al.*, 2008). El inconveniente de estos vectores es que la capacidad queda reducida a la mitad, no pudiendo sobrepasar el tamaño del transgén las 2,35kb.

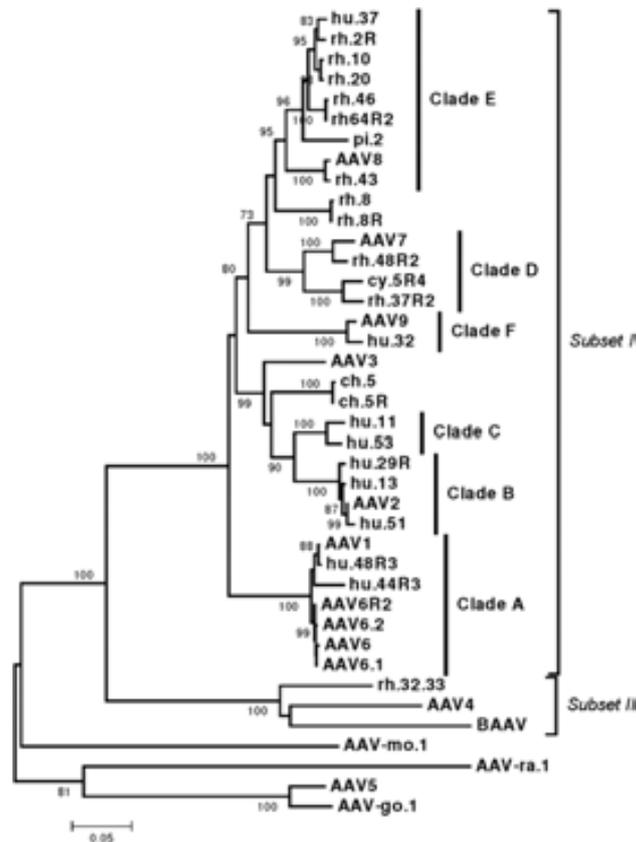
Los AAVs se empezaron a utilizar como vectores de terapia génica porque no causaban enfermedades en humanos a pesar de tener anticuerpos neutralizantes en circulación y porque comparados con los adenovirus no activaban una respuesta inmune del huésped (De Wit J, 2006). Sin embargo ensayos clínicos con AAV2 en músculo esquelético han puesto de manifiesto una respuesta inmune que no se había detectado en los ensayos preclínicos (Mingozzi *et al.*, 2007). Estudios realizados muestran una activación de la respuesta inmunológica debido a la capacidad de los AAVs de infectar células dendríticas, y se están realizando estudios de posibles mecanismos de modulación de la respuesta, además de variaciones en la dosis viral utilizada, para poder realizar los ensayos sin pérdida del vector viral ni del transgén (Herzog *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; Peden *et al.*, 2009).

Algunos ensayos clínicos con vectores adenoasociados que se están realizando o ya han finalizado van dirigidos para enfermedades pulmonares como la fibrosis quística (Flotte *et al.*, 1996; Flotte *et al.*, 2003; Moss *et al.*, 2007), en los pacientes deficientes en alfa-1-antitripsina (Song *et al.*, 2001;

Flotte *et al.*, 2004). También para enfermedades con afectación en SN como Parkinson (Mochizuki and Mizuno, 2003; Feigin *et al.*, 2007), o enfermedad de Canavan (Leone *et al.*, 1999; McPhee *et al.*, 2006), para hemofilia (Kay *et al.*, 2000; Manno *et al.*, 2006), y para enfermedades oculares como la amaurosis congénita de Leber (Maguire *et al.*, 2009; Georgiadis *et al.*, 2010), siendo estos últimos los ensayos que más éxito han reportado y donde los pacientes llegaban a recuperar una parte de la capacidad visual y podían observar sombras.

### 3.1.1. Serotipos de virus adenoasociados

Cuando se empezaron a describir los virus adenoasociados, para definir un nuevo serotipo se determinaba si los sueros específicos con anticuerpos neutralizantes para los serotipos ya descritos inhibían la nueva muestra (Erles *et al.*, 1999). Siguiendo este sistema de caracterización se identificaron seis AAVs diferentes, los serotipos del 1 al 6 que se aislaron de soluciones *stock* de adenovirus, con excepción del AAV5 que se aisló directamente de tejido humano (Schmidt *et al.*, 2006). De los 6 serotipos primeramente descritos sólo AAV4 se le atribuye origen en primates no humanos. Con el tiempo se han ido definiendo nuevos serotipos hasta más de 100 variantes a partir de secuencias aisladas de DNA de tejidos humanos y de primates mediante PCR (Gao *et al.*, 2003). Se ha secuenciado la región del genoma del AAV que codifica para las proteínas de la cápside donde se ha observado una mayor variabilidad en las regiones más externas. Estas regiones comprenden alrededor del 18% de la cápside viral y estas pequeñas variaciones pueden dar las características estructurales y funcionales específicas a cada serotipo (Van Vliet *et al.*, 2006). Además estas secuencias se han utilizado para relacionar todos los serotipos filogenéticamente y clasificar a los diferentes serotipos en 6 clados que se definen como grupos monofiléticos es decir, que presentan un mismo taxón ancestral (Ver **Figura 12**). Los clados A, B, C y D presentan AAVs de origen humano, E tiene AAVs de origen de primate no humano y el clado F presenta AAVs de los dos orígenes.



**Figura 12.** Representación filogenética de los vectores adenoasociados según (Vandenberghe *et al.*, 2009)

Se ha propuesto la utilización de serotipos alternativos para aumentar la eficiencia de transfección de determinados tejidos y también para evitar la respuesta inmune humoral generada por una infección natural o por tratamientos anteriores con AAVs. Además, la generación de vectores quiméricos (pseudotipos) combinando la cápside de un serotipo con el genoma de otro facilita la generación y producción de estos vectores en el laboratorio (McCarty *et al.*, 2004).

### 3.1.2. Transferencia génica con vectores AAV

Desde que se empezaron a utilizar los vectores adenoasociados como herramienta de terapia génica, el vector por excelencia más utilizado fue el AAV2 pues era el mejor caracterizado. Se realizaron muchos estudios de tropismo con AAV2 y se observó que tenía una elevada capacidad de

transducción para diversos tejidos como músculo esquelético y cardíaco, epitelio pulmonar, hígado y cerebro. Posteriormente y con la descripción de los diferentes serotipos de vectores adenoasociados se comparó la transducción de los nuevos vectores con el AAV2 en diferentes tejidos. Así, después de su administración localmente AAV1, 3, 5, 6, 7, 8 y 9 son más eficientes en la transducción de músculo (Apparailly *et al.*, 2005; Arruda *et al.*, 2005; Riviere *et al.*, 2006; Palomeque *et al.*, 2007; Vandendriessche *et al.*, 2007), hígado (Hacker *et al.*, 2005), sistema nervioso central (Taymans *et al.*, 2007; Foust *et al.*, 2009), páncreas (Cheng *et al.*, 2007; Craig *et al.*, 2009) y retina (Surace and Auricchio, 2008; Klimczak *et al.*, 2009; Kolstad *et al.*, 2010), que AAV2, mientras que si se quiere transducir pulmón AAV5 y AAV6 son más indicados, (Li *et al.*, 2009; Limberis *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009b).

Debido a la capacidad de los vectores adenoasociados de infectar células diferenciadas o quiescentes, hace que éstos sean muy atractivos para su utilización en la transducción de sistema nervioso. Igual que para los demás tejidos, los vectores AAV2 son los que se han utilizado más extensamente ya que presenta una elevada eficiencia de transducción de neuronas de las diferentes estructuras cerebrales (Tenenbaum L, 2000). Sin embargo cada vez más, la caracterización de nuevos serotipos recombinantes está mejorando la eficiencia de transducción y la difusión a diferentes regiones cerebrales y medula espinal.

Así, en SNC se han testado diversos serotipos en diferentes ensayos. Se ha estudiado que AAV1 y AAV5 transducen más neuronas que AAV2 (Xu, 2005), (Passini MA, 2003) y, AAV4 presenta especificidad por las células endodiales de los ventrículos cerebrales. AAV1, 2 y 5 también transducen células endodiales (Burger C, 2004).

En regiones como el estriado, hipocampo (región hiliar y neuronas piramidales), *globus pallidus*, sustancia negra, cerebelo y médula espinal, AAV1 y AAV5 presentan una elevada transducción en estas zonas y alta capacidad de difusión en el parénquima cerebral que no se ha observado para AAV2 además de que sólo tiene especificidad por la región hiliar del hipocampo

(Burger C, 2004; Klugmann M, 2005). En otros estudios realizados en SNC inyectando los serotipos AAV7, 8 y 9 y rh10, se ha observado transducción en neuronas de córtex, estriado, hipocampo y tálamo, mostrando el AAVrh10 una mejor eficiencia de transducción en la región talámica comparado con AAV8, sin embargo siendo más eficiente en córtex AAV7 y 9. Al observar la capacidad de difusión a la región contralateral desde el lugar de inyección, el serotipo con mayor eficiencia es AAV9, seguido por AAVrh10, 7 y 8 (Cearley CN, 2006). Principalmente se cree que el tropismo específico de los diferentes vectores para un tipo celular concreto se debe a la estructura de la cápside y a la interacción con receptores específicos, pero también se ha comparado el sistema de purificación durante la producción de los vectores AAV8, 9, rh10 y rh43 por iodixanol y por cloruro de cesio. El tropismo de AAV8 varía según el método de producción, puesto que al ser purificado mediante gradiente de iodixanol transduce mayoritariamente neuronas, y pasa a transducir astrocitos al ser producido mediante cloruro de cesio, debido seguramente a la presencia de proteínas contaminantes de la preparación con cloruro de cesio (Klein *et al.*, 2008).

Para SNP se han utilizado de manera eficiente los HSV. Son exclusivos de neuronas y se distribuyen por el SN mediante transporte axonal retrógrado (Chattopadhyay M, 2005). Sin embargo, a diferencia de los vectores AAV, los vectores HSV utilizados contienen la mayoría de los genes silvestres por lo que podrían dar problemas de bioseguridad en ensayos clínicos. Además, la expresión a largo plazo de genes terapéuticos dirigidos por HSV necesitan promotores de genes latentes de estos virus que no permiten una expresión elevada, en cambio en los vectores AAV se pueden incorporar promotores específicos de tejido y/o fuertes que permitirán una expresión elevada y específica (Shevtsova Z, 2005).

Se ha administrado AAV8 vía intraperitoneal e intravenosa en ratones neonatos y se ha observado transducción tanto de neuronas sensoriales como motoras, aunque también en SNC, corazón, pulmón, hígado y músculo esquelético, debido seguramente a la débil barrera hematoencefálica a esta edad (Foust *et al.*, 2008). La eficiencia de transducción en SNP aumenta si el

serotipo administrado es AAV9 pero también se ha observado infección en tejidos no nerviosos (Duque *et al.*, 2009). Al variar la vía de administración de los vectores virales, la capacidad de transducción de los vectores también se ve afectada. Comparando los serotipos AAV1, 2, 3 y 5 inyectados intratecalmente, el serotipo más eficiente es AAV1 seguido por AAV5 (Storek *et al.*, 2006), con una transducción casi nula por parte de AAV2 y AAV3. Se ha observado una transducción específica de neuronas sensoriales si se inyecta AAV8 (Storek *et al.*, 2008). Debido a la capacidad de retrotransportarse axonalmente de algunos serotipos, se han inyectado intramuscularmente AAV1 y AAV8 mostrando transducción específica de neuronas sensoriales y motoras, aunque existen diferencias según el serotipo, mientras que AAV1 sólo se expresa en la región de la médula espinal próxima al sitio de inyección, AAV8 difunde por la región contralateral al lugar de inyección (Hollis *et al.*, 2008).

En definitiva, la transducción de diferentes regiones del SNP como neuronas sensoriales y motoras mediante terapia génica con vectores adenoasociados podría llegar a ser un tratamiento alternativo para las enfermedades que afectan los nervios periféricos como la neuropatía diabética.

## ***OBJETIVOS***



La *diabetes mellitus* es un trastorno multisistémico y multifactorial que tiene como característica principal el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). A pesar del tratamiento con insulina, los pacientes con diabetes acaban desarrollando diferentes complicaciones como la neuropatía diabética (ND), que presenta una prevalencia del 60% del total de los pacientes.

Debido a la gran variedad de factores causales que contribuyen en la patogenia y a la sintomatología presente de la ND, no existe un tratamiento único satisfactorio. Para ello, y como objetivo general, nos planteamos la necesidad de profundizar en el mecanismo patogénico que lleva al desarrollo de la complicación y especialmente en qué tipo celular está primariamente afectado al inicio del desarrollo de la complicación con el fin de poder abordar estrategias de tratamiento alternativas.

Para conseguir este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el efecto del aumento de la concentración de glucosa sobre las SC *in vitro*, en cultivos establecidos y primarios, en cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias e *in vivo* en nervios ciáticos de ratones diabéticos.
2. Analizar el efecto del aumento de la concentración de glucosa en las neuronas *in vitro*, en cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias, en cultivos purificados de neuronas sensoriales y en cultivos de motoneuronas e *in vivo* en ganglios de la raíz dorsal y en médula espinal de ratones diabéticos.
3. Producir vectores virales con genes terapéuticos, testar su funcionalidad y evaluar su potencial como tratamiento alternativo en un modelo de ND.



## ***RESULTADOS***

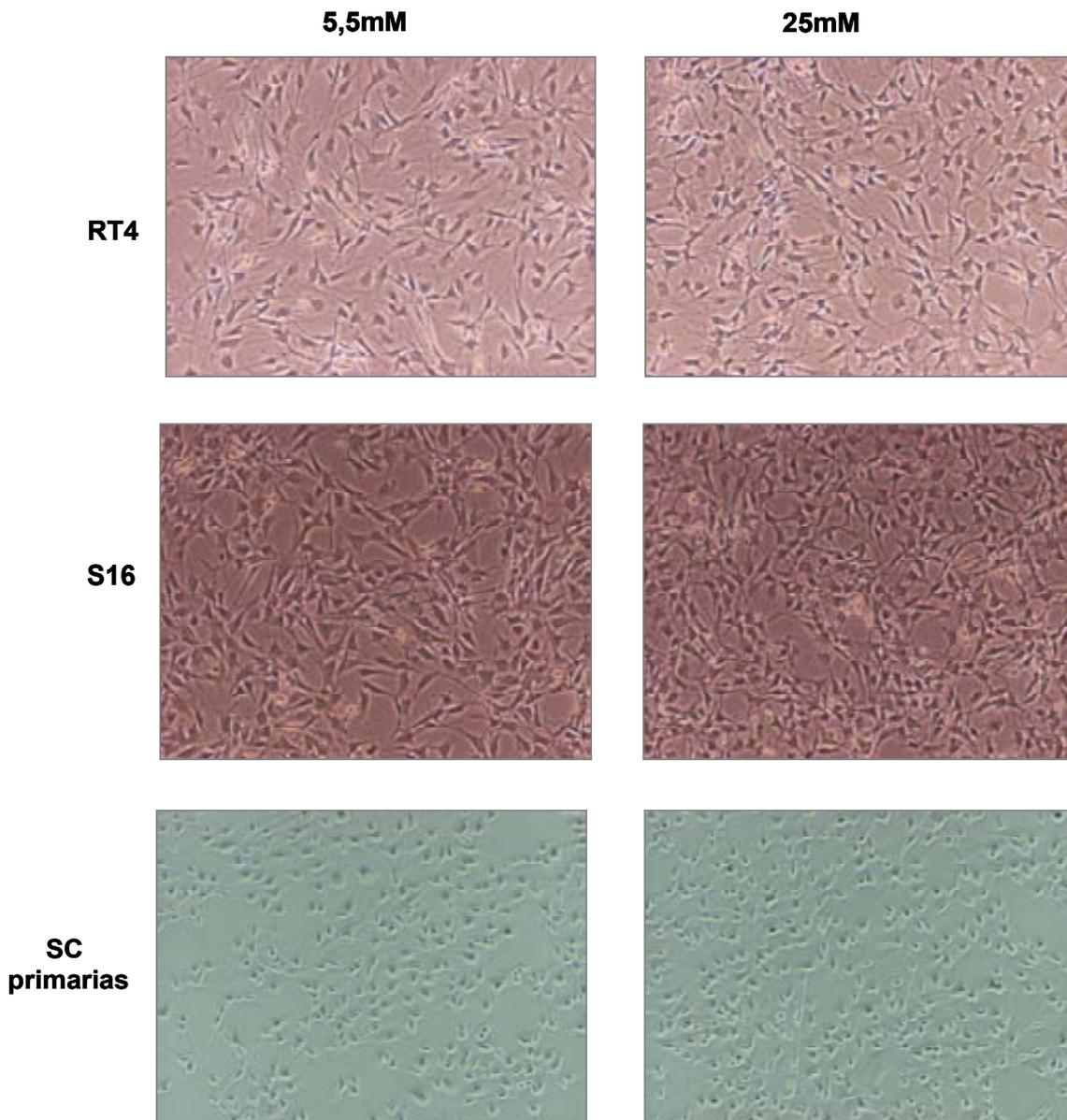


# 1. EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE SCHWANN

## 1.1. Estudio de la expresión de P0 en cultivos de SC

En la patología de la neuropatía diabética los componentes tanto periféricos como somáticos están dañados y los pacientes presentan alteraciones electrofisiológicas en estos nervios. No obstante, existe controversia en cuál es el tipo celular primariamente afectado por la hiperglucemia/hipoinsulinemia de los pacientes con esta complicación. Se ha descrito la disminución de la capacidad de regeneración del SNP de los pacientes diabéticos. Además, es conocido el papel de las SC en la regeneración, su capacidad de desdiferenciación, proliferación y diferenciación en SC mielinizantes. Por eso, en una fase inicial del estudio estudiamos qué grado de afectación presentaban las SC cultivadas con diferentes concentraciones de glucosa. Para estos experimentos se utilizaron dos cultivos establecidos (RT4 y S16) y cultivos primarios de SC.

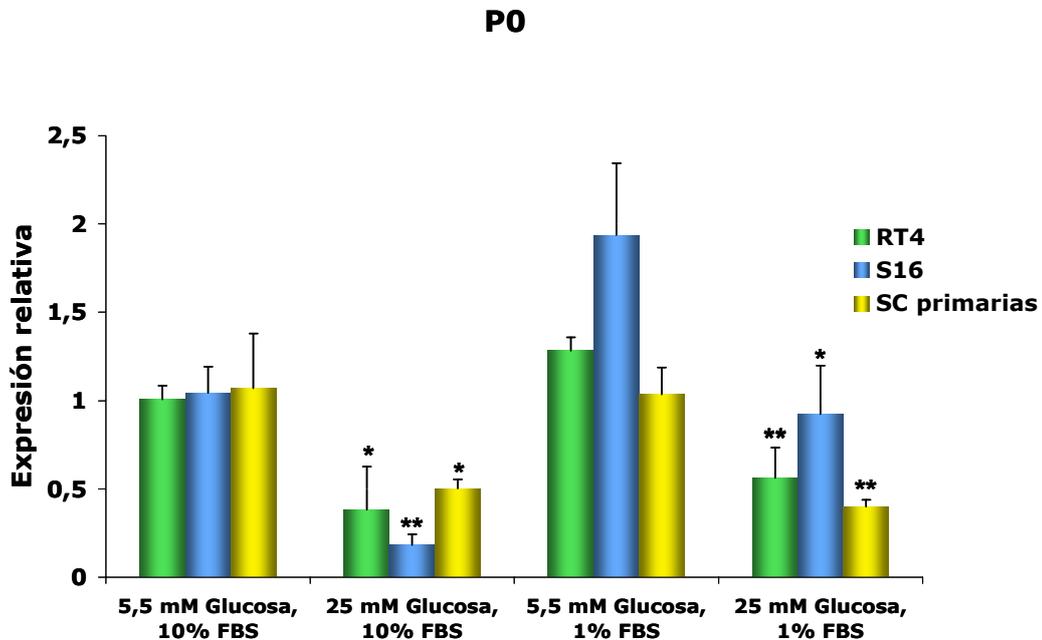
Habitualmente los cultivos celulares se realizan con unas concentraciones de glucosa de 25mM, consideradas hiperglucémicas para los humanos. Por este motivo, antes de empezar cada experimento se les realizó un “*starving*” de 16 horas, con medio con baja glucosa (5,5mM), para conseguir sincronizar todas las células y poder observar el efecto del tratamiento con la misma concentración de glucosa a la que normalmente están cultivadas. Por otra parte, en los primeros experimentos también se quiso testar el papel de la insulina en la afectación de la expresión de los genes a analizar, de ahí que se utilizara el medio suplementado con 1% y 10% de FBS que recrea la hipoinsulinemia y la hiperinsulinemia respectivamente.



**Figura 13.** Imágenes de los cultivos de RT4, S16 y SC primarias incubados con diferentes concentraciones de glucosa. Imágenes tomadas a 100X aumentos.

En las imágenes de la **Figura 13** se pueden observar los cultivos de SC utilizados en los experimentos de análisis de expresión de la proteína P0, donde no se observan diferencias morfológicas significativas ni muerte celular después de realizar el *starving* e incubar con 5,5 y 25mM de glucosa. Aunque no se muestran, tampoco se observaron cambios en cuanto a estos parámetros con las diferentes concentraciones de FBS utilizado.

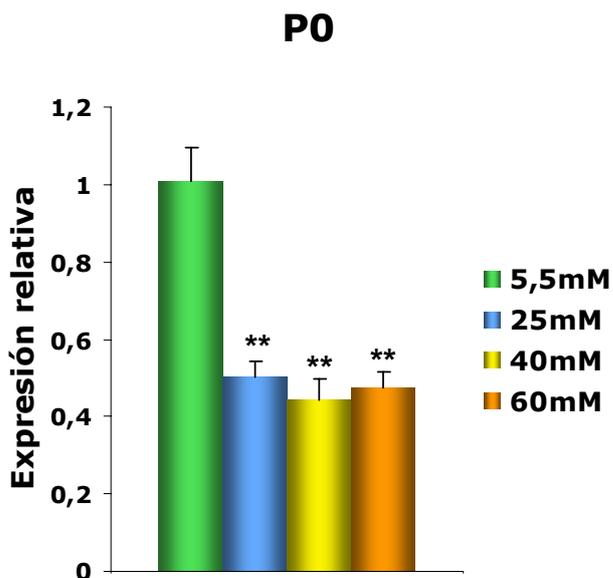
En el primer experimento se analizó la expresión de la principal proteína de la mielina, P0, mediante real-time PCR en cultivos de SC después de hacerles un *starving* O/N e incubación durante 24h en diferentes concentraciones de glucosa e insulina.



**Figura 14.** Expresión de P0 en RT4, S16 y SC primarias cultivadas con 5,5mM o 25mM de glucosa y con 1% o 10% de FBS.  
(n=6 para cada condición; \*p<0,05 y \*\*p<0,01)

Los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa en la **Figura 14**, muestran una disminución en la expresión de la proteína P0 del 60% en RT4, 80% en S16 y 55% en SC primarias cuando se mantiene constante el FBS al 10% y se aumenta la glucosa, siendo una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$  en RT4 y SC primarias;  $p < 0,01$  para S16). Además, cuando se mantiene constante el FBS al 1% y se aumenta la glucosa también disminuye la expresión de P0 en un 55% para RT4, un 50% en S16 y un 61% en SC primarias, siendo una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,01$  para RT4 y SC primarias;  $p < 0,05$  para S16).

En otro experimento y viendo que la expresión de P0 no estaba influenciada por el % de FBS, se incubaron las SC primarias con concentraciones crecientes de glucosa.



**Figura 15.** Expresión de P0 en SC primarias cultivadas con concentraciones crecientes de glucosa. (n=6 para cada condición; \*\*p<0,01)

Al analizar los resultados de mRNA de la **Figura 15** podemos observar que existe una disminución de la expresión alrededor del 50% de P0 con 25mM, estadísticamente significativa ( $p<0,01$ ) pero que no se ve incrementada a concentraciones de glucosa más elevadas.

En estos cultivos se intentaron analizar por real-time PCR la expresión de otras de las principales proteínas de la mielina y también de diferentes factores de transcripción implicados en mielinización, pero la cantidad de mRNA que había en las muestras era demasiado pequeña y quedaba fuera del límite de detección lineal de la técnica por lo que no se pudieron conseguir resultados fiables.

Para confirmar la disminución de la expresión de la proteína P0, se realizó un experimento de transfección en los cultivos establecidos con un plásmido que contenía el cDNA de GFP bajo promotor de la proteína P0 y 48h después se realizó el *starving* de las células y se incubaron con 5,5 y 25mM de glucosa y también con 1% y 10% de FBS, para posteriormente estudiar el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> y observar el efecto de los cambios en la concentración de glucosa e insulina sobre el promotor.

A

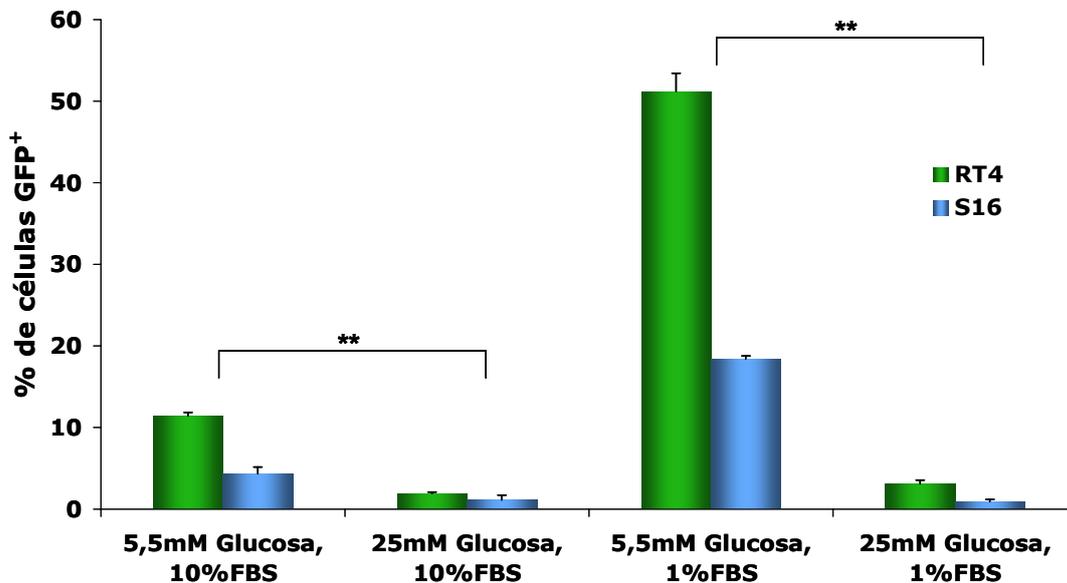


**Figura 16.** Análisis del efecto de la glucemia sobre el promotor P0. **A)** Representación esquemática del plásmido utilizado en la transfección, que expresa la proteína GFP bajo el promotor de la proteína P0. **B)** Representación de las células GFP<sup>+</sup> en cada condición de cultivo, normalizadas por las células GFP<sup>+</sup> obtenidas con un plásmido que presentaba un promotor ubicuo y no alterable con las diferentes condiciones de cultivo para normalizar las diferencias de transfección en las distintas condiciones metabólicas.

(n=6 para cada condición; \*p<0,05 y \*\*p<0,01)

B

### Expresión de GFP bajo promotor P0



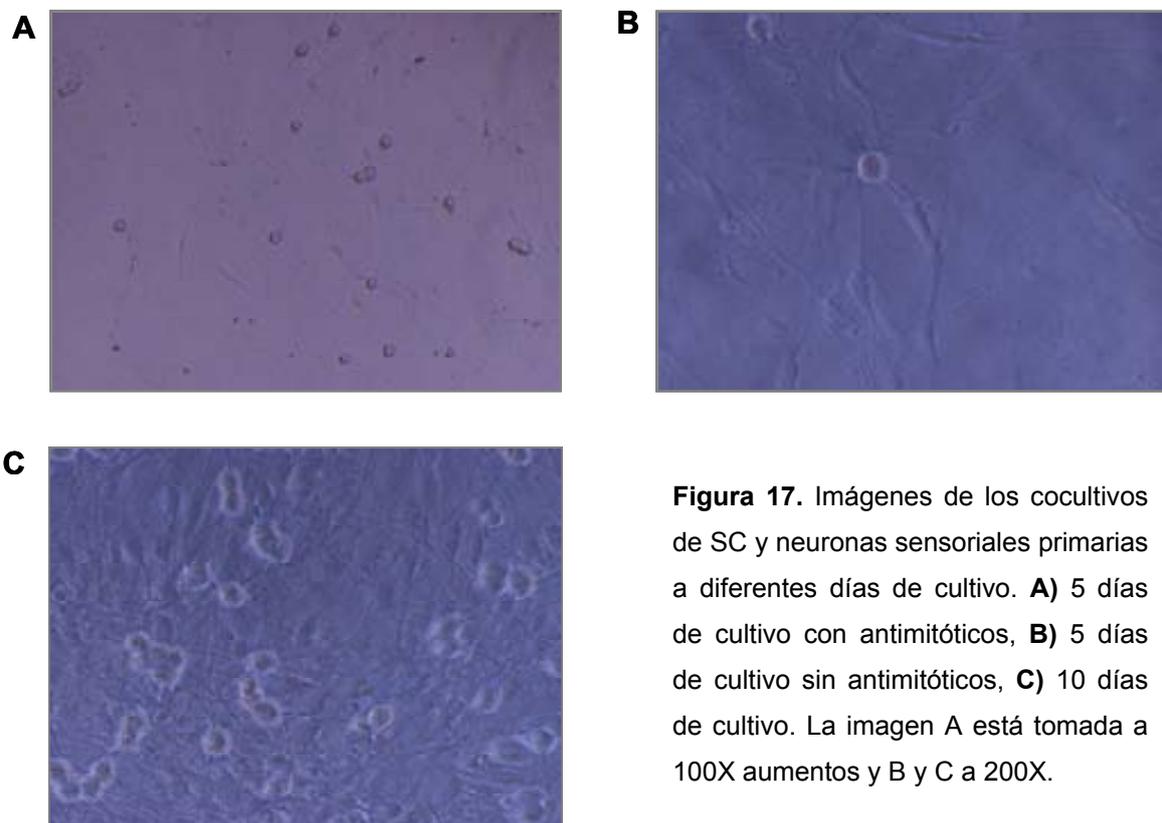
Los resultados de FACS de la **Figura 16**, muestran una disminución en la expresión de P0 del 80% en RT4 y 55% en S16 cuando se mantiene constante el FBS al 10% y se aumenta la glucosa, siendo una disminución estadísticamente significativa para RT4 y S16 (p<0,01). Además cuando se mantiene constante el FBS al 1% y se aumenta la glucosa, también disminuye la expresión de P0 en un 80% tanto en RT4 como S16, disminución estadísticamente significativa para ambos cultivos celulares (p<0,01).

Estos datos demuestran que independientemente del % de FBS utilizado la elevada concentración de glucosa está disminuyendo la expresión de GFP dirigida por el promotor P0, ya que está disminuyendo la actividad del promotor de la principal proteína de la mielina. No se observaron cambios en la expresión con un promotor CAG (promotor del citomegalovirus (CMV) con enhancer de *chicken  $\beta$ -actin*), datos que fueron utilizados para normalizar la expresión de GFP.

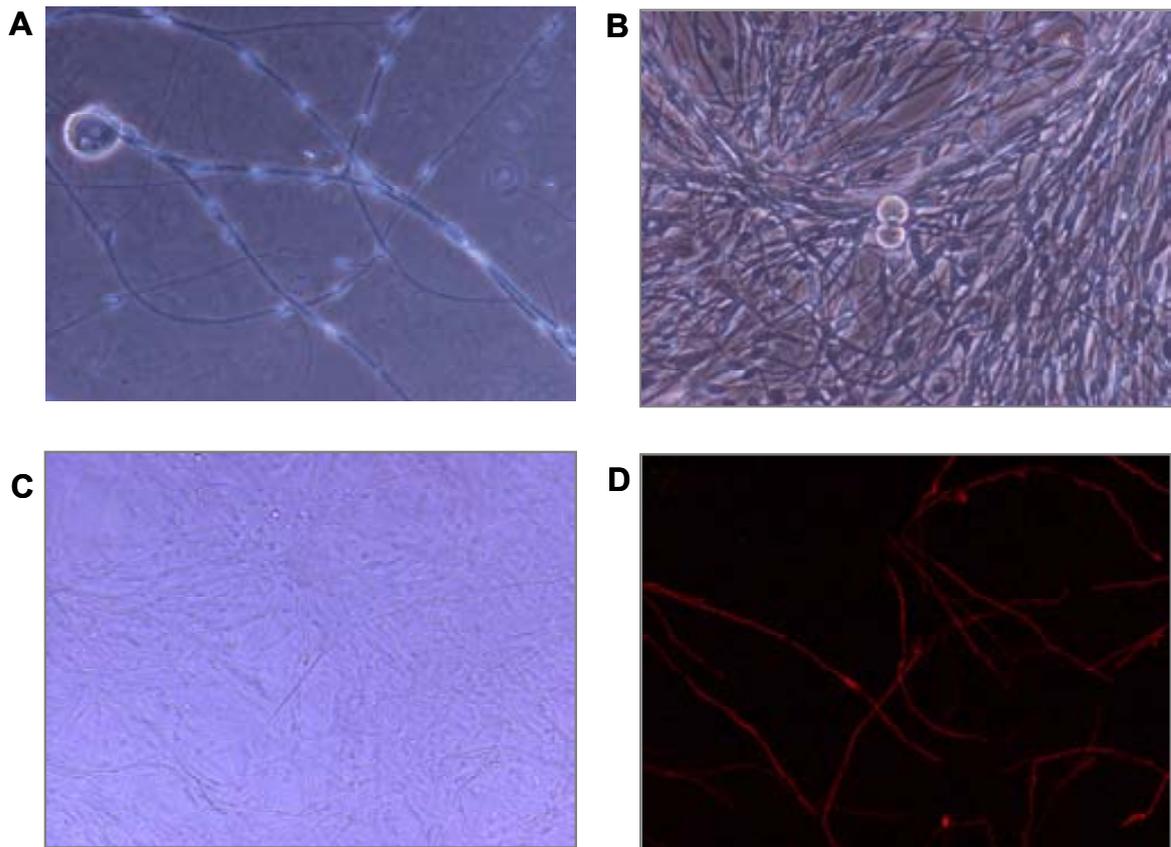
### 1.2. Estudio de la expresión de las principales proteínas de la mielina en cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias

Los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias son un modelo *in vitro* de mielinización que nos permite estudiar con más detalle el efecto de la elevada concentración de glucosa sobre las proteínas de la mielina producidas por las SC.

Las imágenes tomadas a diferentes días de cultivo permiten ver la evolución del estado de los cocultivos hasta la mielinización.

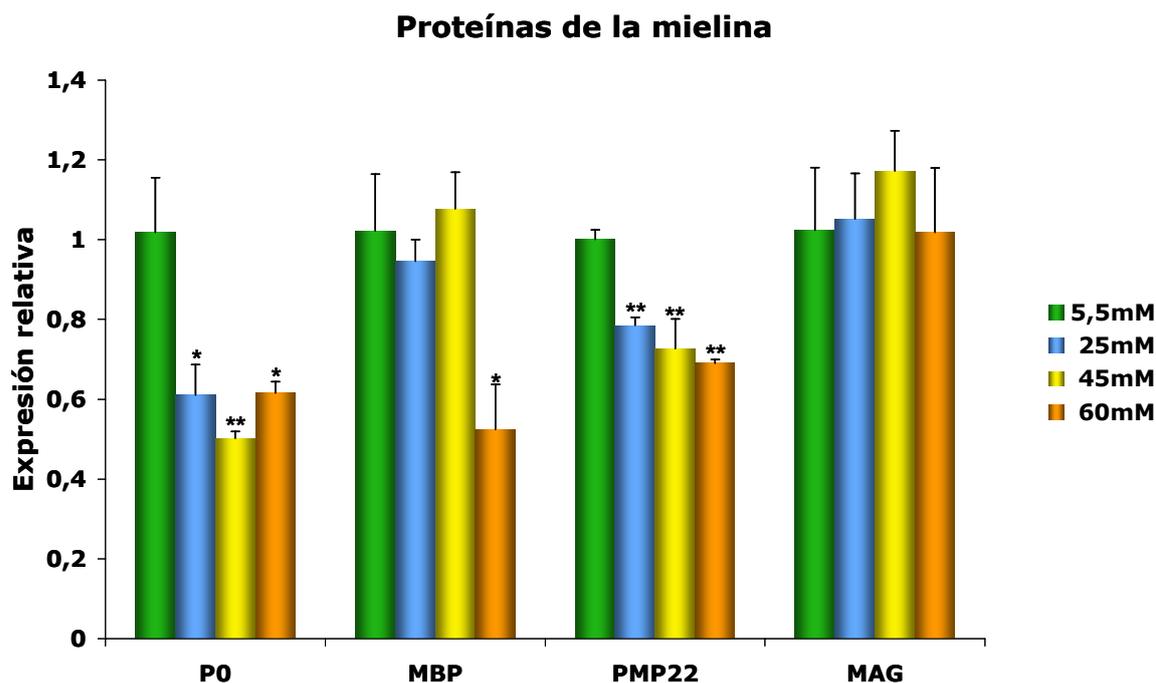


**Figura 17.** Imágenes de los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias a diferentes días de cultivo. **A)** 5 días de cultivo con antimitóticos, **B)** 5 días de cultivo sin antimitóticos, **C)** 10 días de cultivo. La imagen A está tomada a 100X aumentos y B y C a 200X.



**Figura 18.** Imágenes de los cocultivos a diferentes días de cultivo. **A)** 20 días de cultivo, **B)** 30 días de cultivo y **C y D)** 42 días de cultivo, **D)** es una inmunocitoquímica con MBP que nos permite visualizar la mielinización. Son imágenes de cocultivos sin antimitóticos, induciendo mielinización endógena con las propias SC presentes en los cultivos. Las imágenes A y B están tomadas a 200X aumentos y C y D a 100X.

Una vez los cultivos estuvieron mielinizados, después de 42 días, se procedió a realizar el *starving* O/N y la incubación con diferentes concentraciones de glucosa durante 24h y se analizó mediante PCR cuantitativa la expresión de las principales proteínas de la mielina.

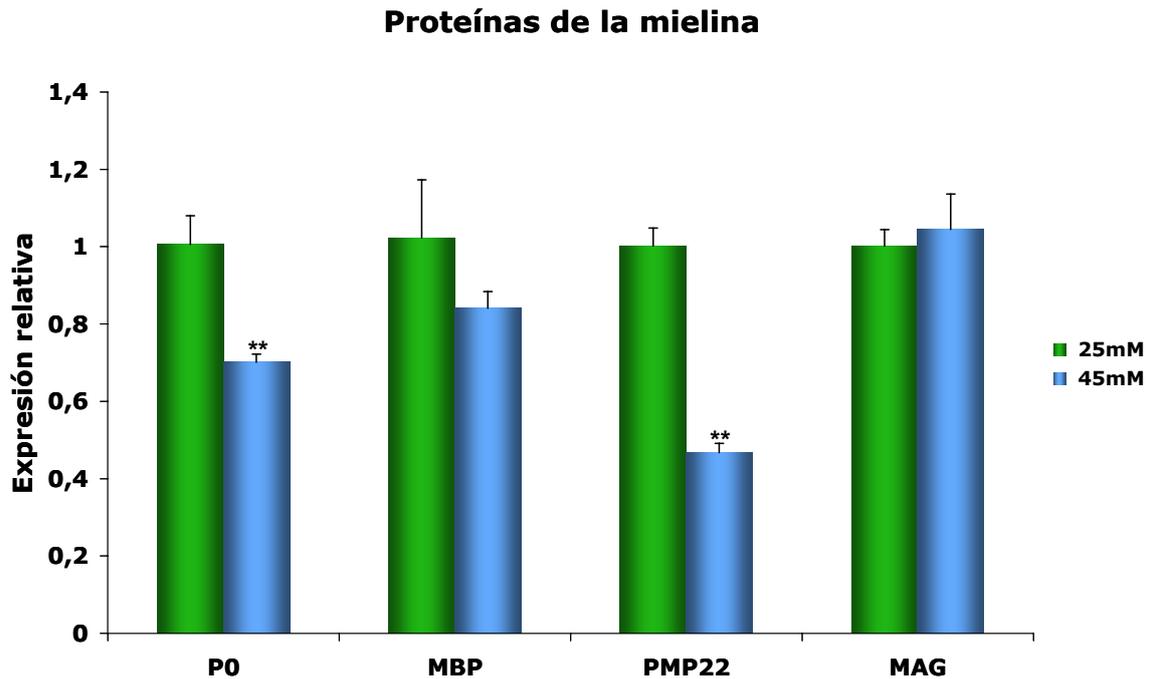


**Figura 19.** Expresión de las proteínas de la mielina en cocultivos de SC primarias y neuronas sensoriales cultivados hasta mielinización y posteriormente con diferentes concentraciones de glucosa.

(n=6 para cada condición; \*p<0,05 y \*\*p<0,01)

Los resultados de la **Figura 19** muestran una disminución sobre el 40% en la expresión de P0 estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ) y entre el 25-35% para PMP22 ( $p<0,01$ ) en las diferentes concentraciones de glucosa analizadas. Para MBP sólo se observan cambios estadísticamente significativos a 60mM con una disminución del 50% ( $p<0,05$ ) y ningún cambio en la expresión de MAG. Igual que en los cultivos de SC los resultados indican que no hay una correlación lineal en la disminución de la expresión a más concentración de glucosa utilizada.

Para descartar el efecto del *starving* en los cambios de expresión de las proteínas de la mielina, los cultivos se mantuvieron con elevada concentración de glucosa y simplemente analizamos la expresión de las proteínas de la mielina tras un incremento de glucosa de 20mM.



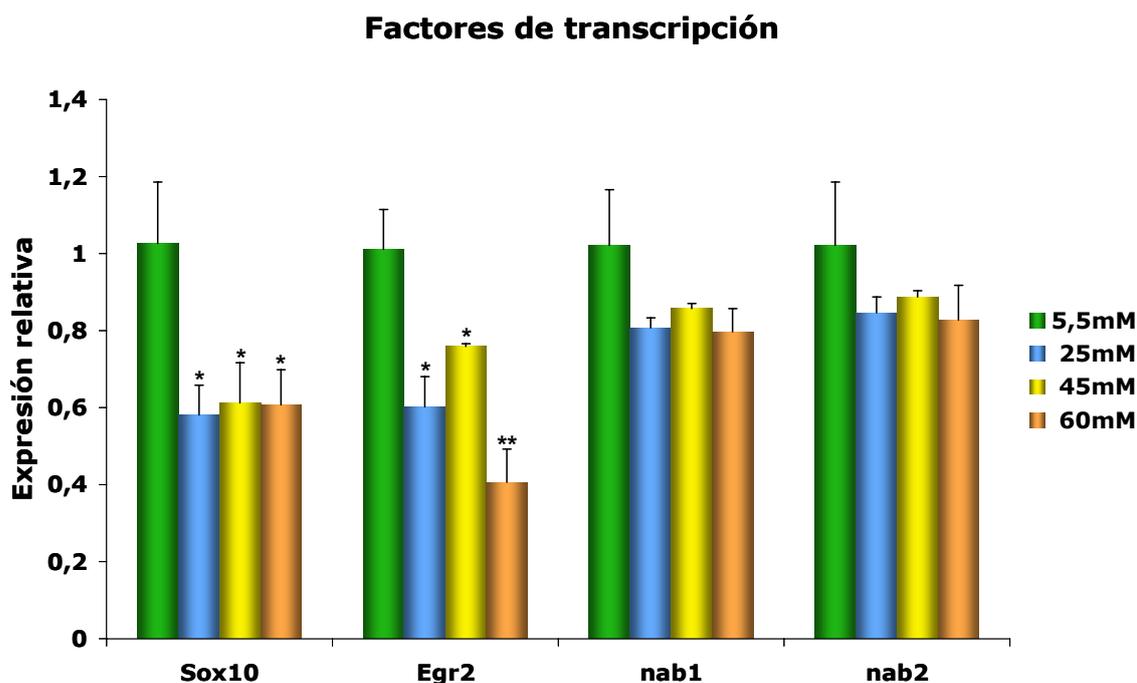
**Figura 20.** Expresión de las proteínas de la mielina en cocultivos de SC primarias y neuronas sensoriales cultivados hasta mielinización y posteriormente con un aumento en la concentración de glucosa de 20mM.  
(n=3 para cada condición; \*p<0,05 y \*\*p<0,01)

Los resultados de la **Figura 20** muestran una disminución del 30% en la expresión de P0 y sobre el 50% en el caso de PMP22, estadísticamente significativa ( $p<0,01$ ) tras el incremento en la concentración de glucosa de 20mM durante 24h. Para MBP se observa una ligera disminución que no es estadísticamente significativa, y no se observan cambios en la expresión de MAG.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos con un *starving* previo a la incubación de las células con las diferentes concentraciones de glucosa y nos demuestran que es el incremento en la concentración de la glucosa lo que está afectando la expresión de las principales proteínas de la mielina.

### 1.3. Estudio de la expresión de los principales factores de transcripción implicados en mielinización en cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias

En la regulación de la síntesis de las proteínas de la mielina por las SC mielinizantes intervienen diferentes factores de transcripción promielinizantes, de entre ellos los más importantes Oct6, Brn2, Sox10 y Egr2. Su expresión está involucrada directamente con la de las principales proteínas de la mielina. Como hemos comentado anteriormente los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias nos permiten un estudio del proceso de la mielinización, por lo que estudiamos la alteración a nivel de mRNA de Sox10, Egr2 y sus correguladores nab1 y nab2.

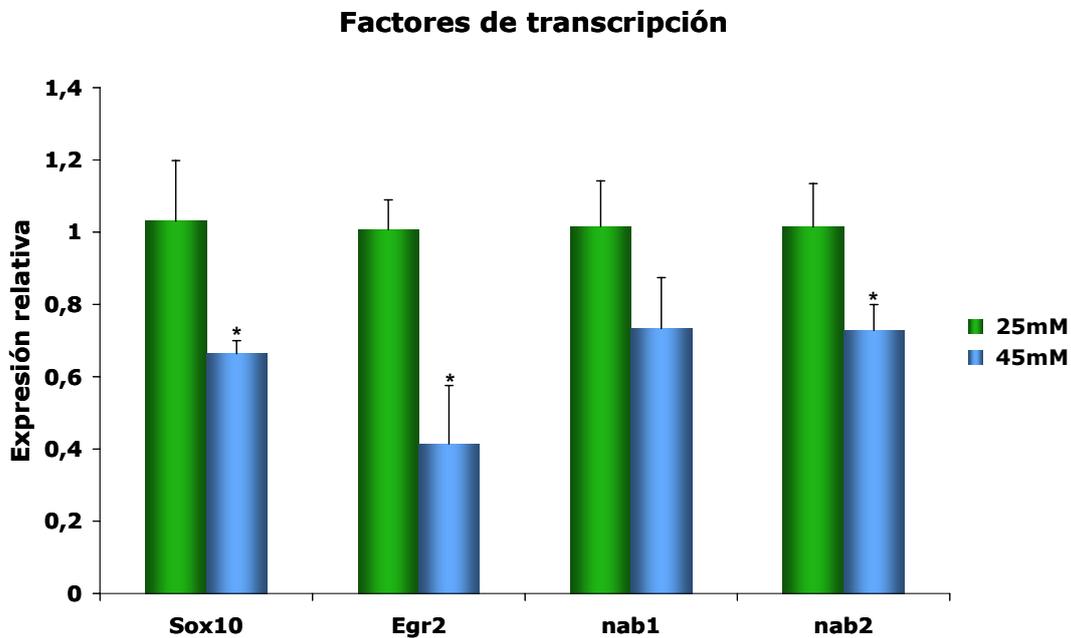


**Figura 21.** Expresión de los principales factores de transcripción implicados en mielinización en cocultivos de SC primarias y neuronas sensoriales cultivados hasta mielinización y posteriormente en diferentes concentraciones de glucosa.

(n=6 para cada condición; \*p<0,05 y \*\*p<0,01)

Los resultados de la **Figura 21** muestran que la elevada concentración de glucosa induce una disminución del mRNA de Sox10 y Egr2 que está sobre el 40% y es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), en las condiciones ensayadas. Para los correguladores de Egr2, nab1 y nab2, también se observa una tendencia a la disminución aunque los resultados no son estadísticamente significativos.

Igual que para las proteínas de la mielina, se analizó la expresión de los factores de transcripción sólo con un incremento en la concentración de glucosa de 20mM.



**Figura 22.** Expresión de los principales factores de transcripción implicados en mielinización en cocultivos de SC primarias y neuronas sensoriales cultivados hasta mielinización y posteriormente con un aumento en la concentración de glucosa de 20mM. (n=3 para cada condición; \* $p < 0,05$ )

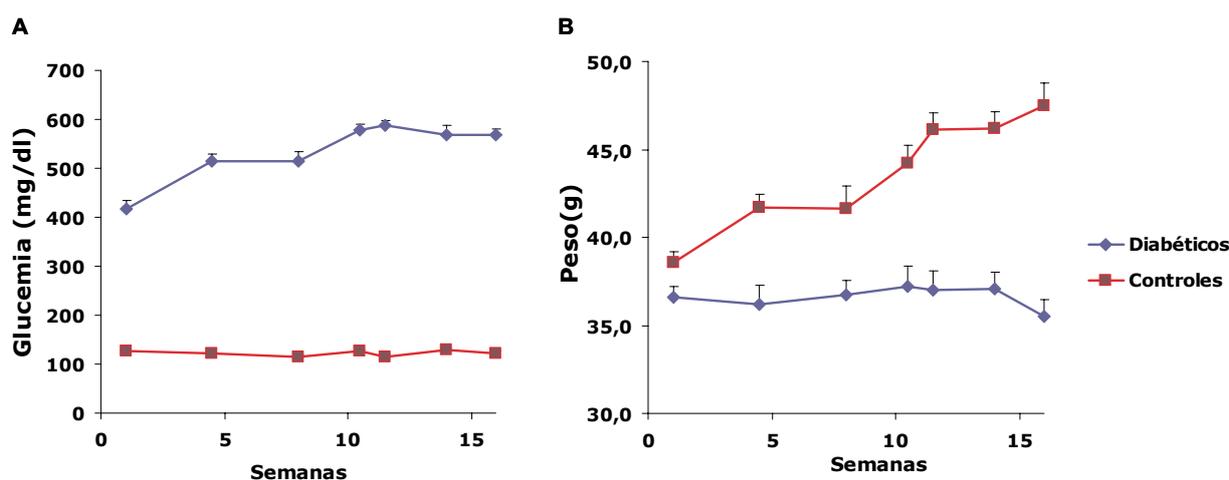
Los resultados de la **Figura 22** nos muestran una disminución alrededor del 35% para Sox10, del 60% para Egr2 y del 25% para su correguladora nab2 que es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) al aumentar la concentración de glucosa en 20mM en los cocultivos de SC primarias y neuronas sensoriales. La expresión de nab1 también se ve disminuida aunque sin ser estadísticamente significativa.

## 2. EFECTOS DE LA HIPERGLUCEMIA EN CÉLULAS DE SCHWANN *IN VIVO*

Con la finalidad de comprobar los resultados obtenidos *in vitro*, se analizaron tanto las proteínas de la mielina como los factores de transcripción en los nervios ciáticos de ratones ICR adultos o jóvenes (día postnatal 18, P18) a los que se les había inducido diabetes experimental mediante inyecciones de STZ, y en ratones NOD, otro modelo de diabetes tipo I, que desarrollan la enfermedad espontáneamente.

### 2.1. Análisis del efecto de la hiperglucemia en nervios ciáticos de ICR adultos

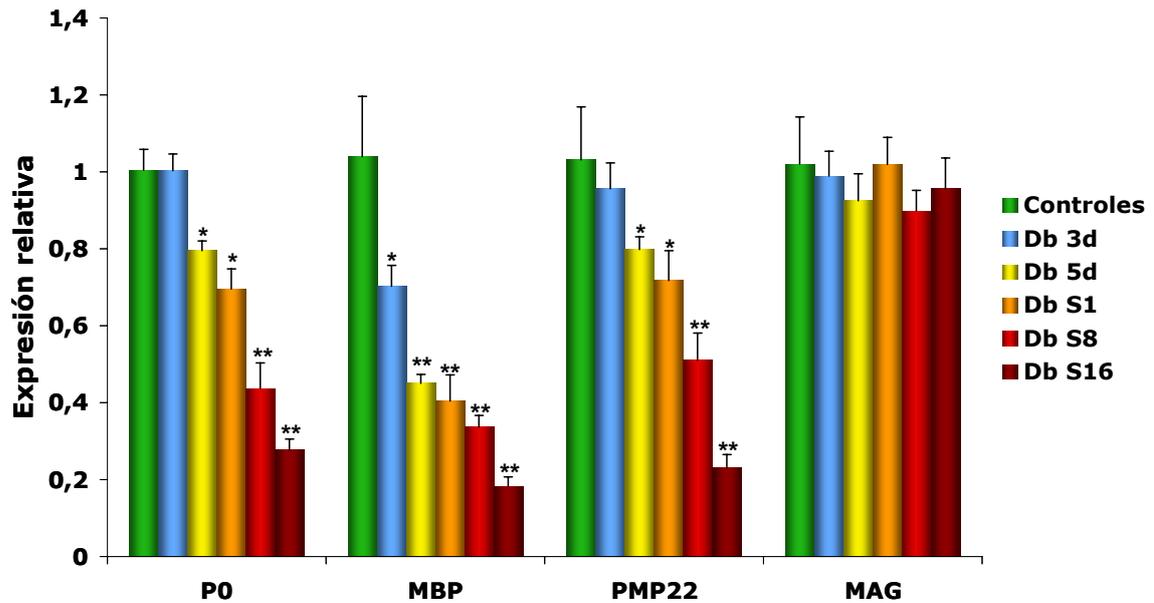
Los resultados de la **Figura 23** nos muestran la evolución en la glucemia y en el peso de los animales utilizados. Los animales se consideran diabéticos con una glucemia superior a 300mg/dl. Los ratones sacrificados tenían una glucemia entre 400 y 600mg/dl (límite máximo de detección del glucómetro) y sólo a semana 16 de diabetes se pudo observar una pérdida de peso superior al 10%.



**Figura 23.** Representación de la evolución en la glucemia (A) y en el peso (B) de los animales utilizados.

Los ratones ICR adultos diabéticos, se sacrificaron y se tomaron muestras de nervio ciático a 3 días, 5 días, 1 semana, 8 semanas y 16 semanas después de la última inyección de STZ. Los nervios ciáticos fueron procesados y se analizó mediante real-time PCR la expresión de las principales proteínas de la mielina.

### Proteínas de la mielina



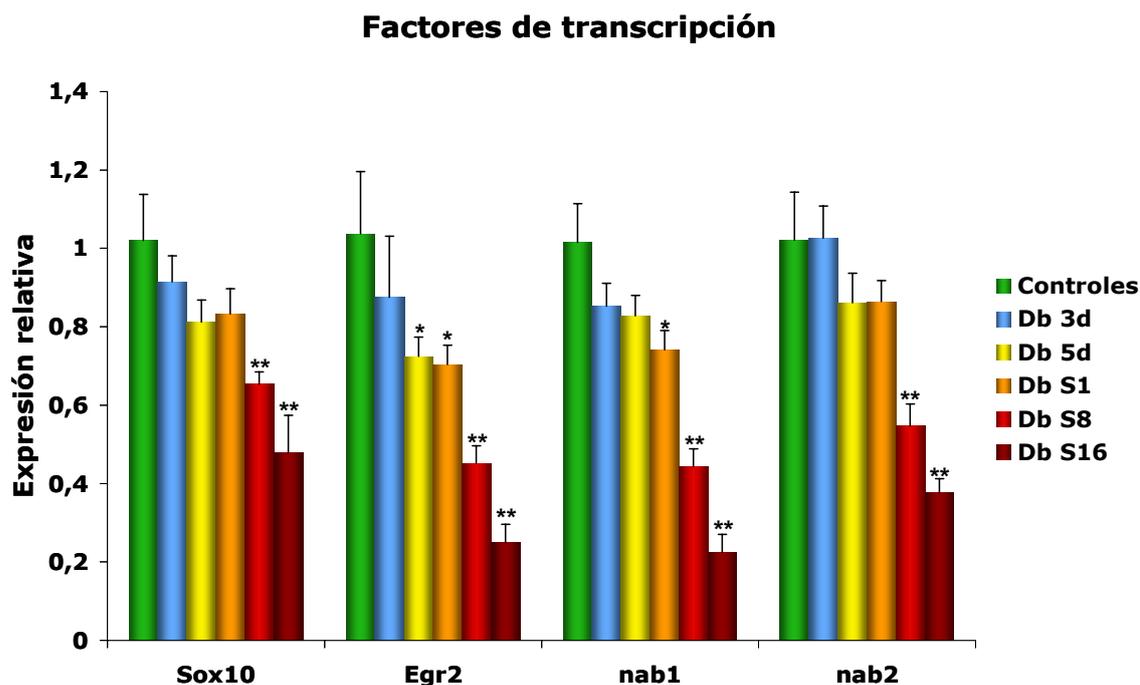
**Figura 24.** Expresión de las proteínas de la mielina en nervios ciáticos de ratones ICR sacrificados a diferentes días después de la inducción de la diabetes.

Db: diabéticos, d: día, S: semana, tiempo después de la última inyección de STZ.

(n=5 para todos los puntos excepto Db 3d donde n=4; \*p<0,05 y \*\*p<0,01)

Los resultados de la **Figura 24** nos muestran como la expresión de las proteínas P0, MBP y PMP22 va disminuyendo a medida que los ratones avanzan en tiempo de diabetes, hasta el 70-80% a semana 16, disminución estadísticamente significativamente (p<0,01). No se observaron cambios en la expresión de MAG en ninguno de los puntos analizados.

Además de analizar las proteínas de la mielina también se estudió mediante real-time PCR qué pasaba con los principales factores de transcripción relacionados con la expresión de las proteínas de la mielina en los nervios ciáticos de ratones diabéticos.



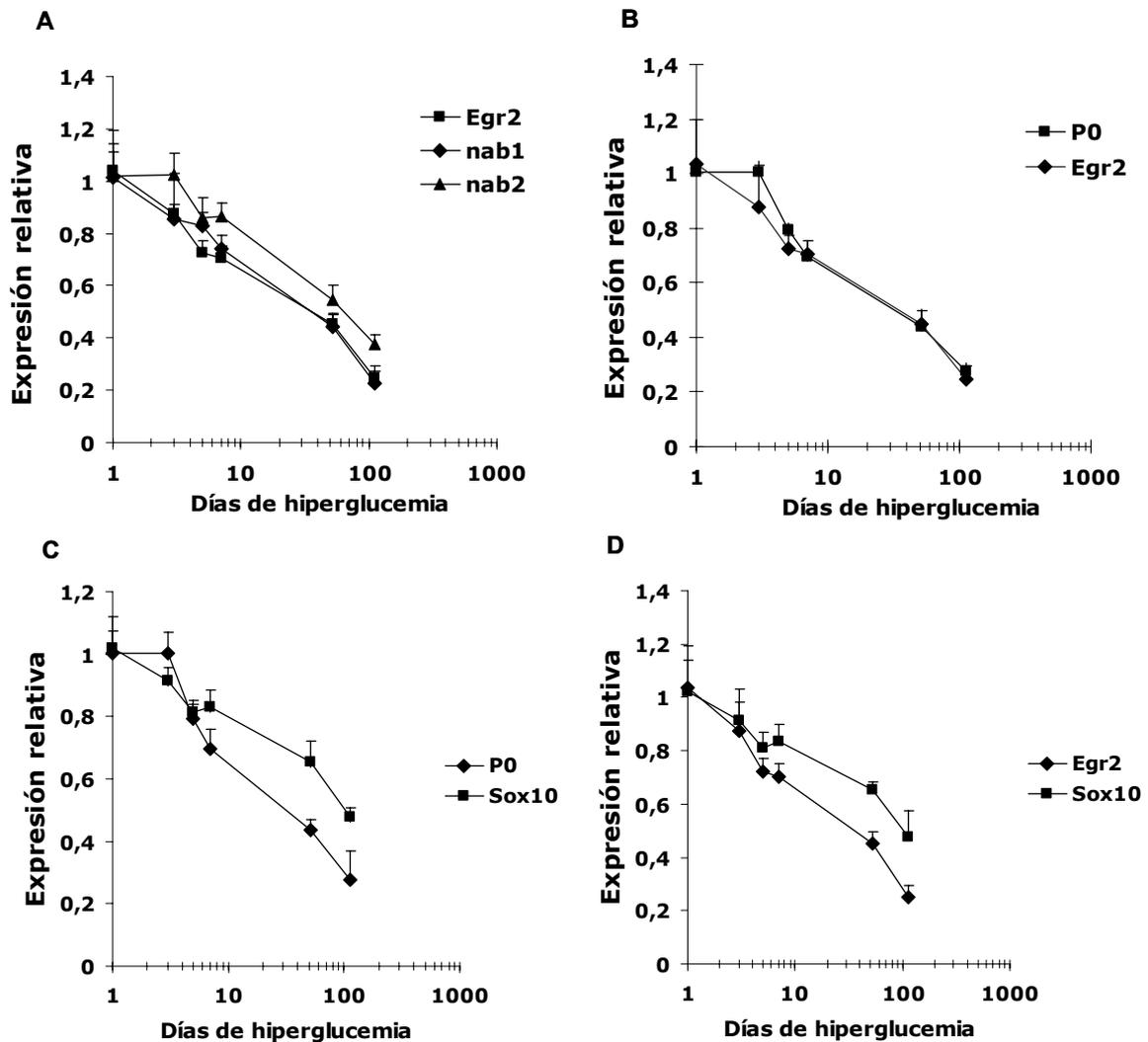
**Figura 25.** Expresión de los principales factores de transcripción implicados en mielinización en nervios ciáticos de ratones ICR sacrificados a diferentes días después de la inducción de la diabetes.

Db: diabéticos, d: día, S: semana, tiempo después de la última inyección de STZ.  
(n=5 para todos los puntos excepto Db 3d donde n=4; \*p<0,05 y \*\*p<0,01)

Los resultados de la **Figura 25** nos indican una disminución del 40 y 50% en la expresión de Sox10 estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ), a 8 y 16 semanas después de la inducción de la diabetes, para Egr2 la disminución empieza a ser significativa ya a 5 días después de que los animales sean diabéticos y va disminuyendo cada vez más a semana 8 y 16 después de la inducción con STZ, hasta llegar al 30% de la expresión respecto los animales controles. Para los correguladores de Egr2, nab1 y nab2 la disminución es estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) a semana 8 y 16 después de la inducción de la diabetes, llegándose a niveles del 30 y del 40% respectivamente.

Si correlacionamos la evolución de la expresión entre Egr2 y sus correguladores nab1 y nab2, y la relación entre la disminución de la expresión de los factores de transcripción y de P0, a los diferentes tiempos estudiados

después de la inducción de la diabetes experimental, observamos una relación lineal.



**Figura 26.** Evolución en la expresión de **A)** Egr2, nab1 y nab2, **B)** P0 y Egr2, **C)** P0 y Sox10, **D)** Egr2 y Sox10.

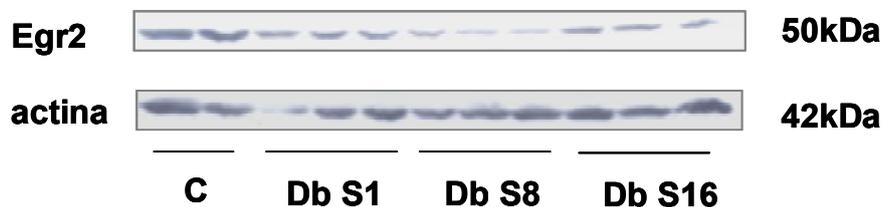
Db: diabéticos, d: día, S: semana, tiempo después de la última inyección de STZ.

(n=5 para todos los puntos excepto Db 3d donde n=4)

Como se puede observar en la **Figura 26**, claramente las expresiones de Egr2 y sus correguladores están directamente relacionadas y también la expresión de Egr2 y la proteína de la mielina P0. La expresión de Sox10 aunque también presenta una evolución muy similar, disminuye a menor velocidad.

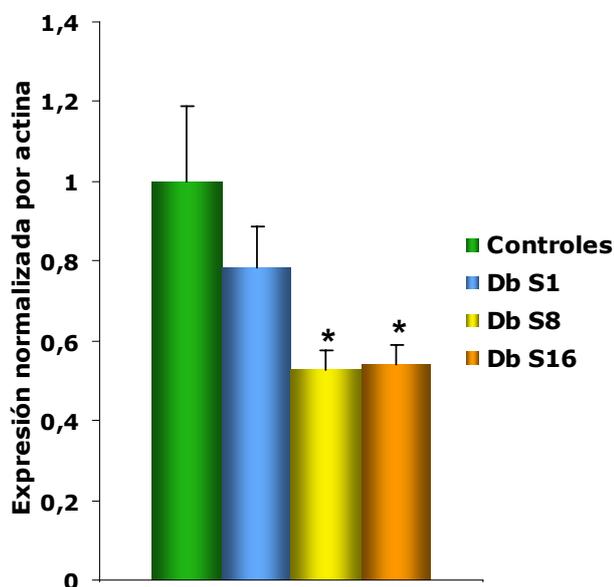
Se analizaron los niveles de proteína de Egr2 por WB.

A



B

Egr2



**Figura 27.** Análisis de la expresión de Egr2 a diferentes días después de la inducción de la diabetes. **A)** WB de Egr2 y actina representativo con unas muestras de cada tiempo estudiado, **B)** Representación de la densitometría de las bandas de Egr2 normalizadas por las de actina. (n=5 para controles, n=6 para S1, n=5 para S8 y n=6 para S16; \*p<0,05)

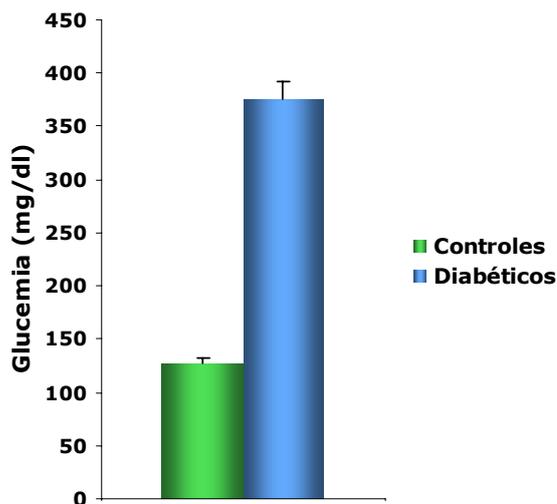
Como se puede observar en la **Figura 27**, la expresión de Egr2, también está disminuida en nervios ciáticos de los ratones diabéticos y como a nivel de mRNA, los ratones que llevan un período de tiempo más largo con hiperglucemia presentan una expresión menor, con una reducción del 50% aproximadamente, como se puede observar a semana 8 y 16. Sin embargo no vemos diferencias entre semana 8 y 16.

También se analizó la expresión de las proteínas de la mielina como MBP y P0, pero no se observaron diferencias significativas, debido seguramente a que estas proteínas presentan un *turnover* que puede llegar a ser de 210 días, y 8 semanas después del nacimiento, cuando se administra

las dosis de STZ, las proteínas de la mielina ya están plenamente establecidas (Singh and Jungalwala, 1979).

## 2.2. Análisis del efecto de la hiperglucemia en nervios ciáticos de ratones ICR jóvenes

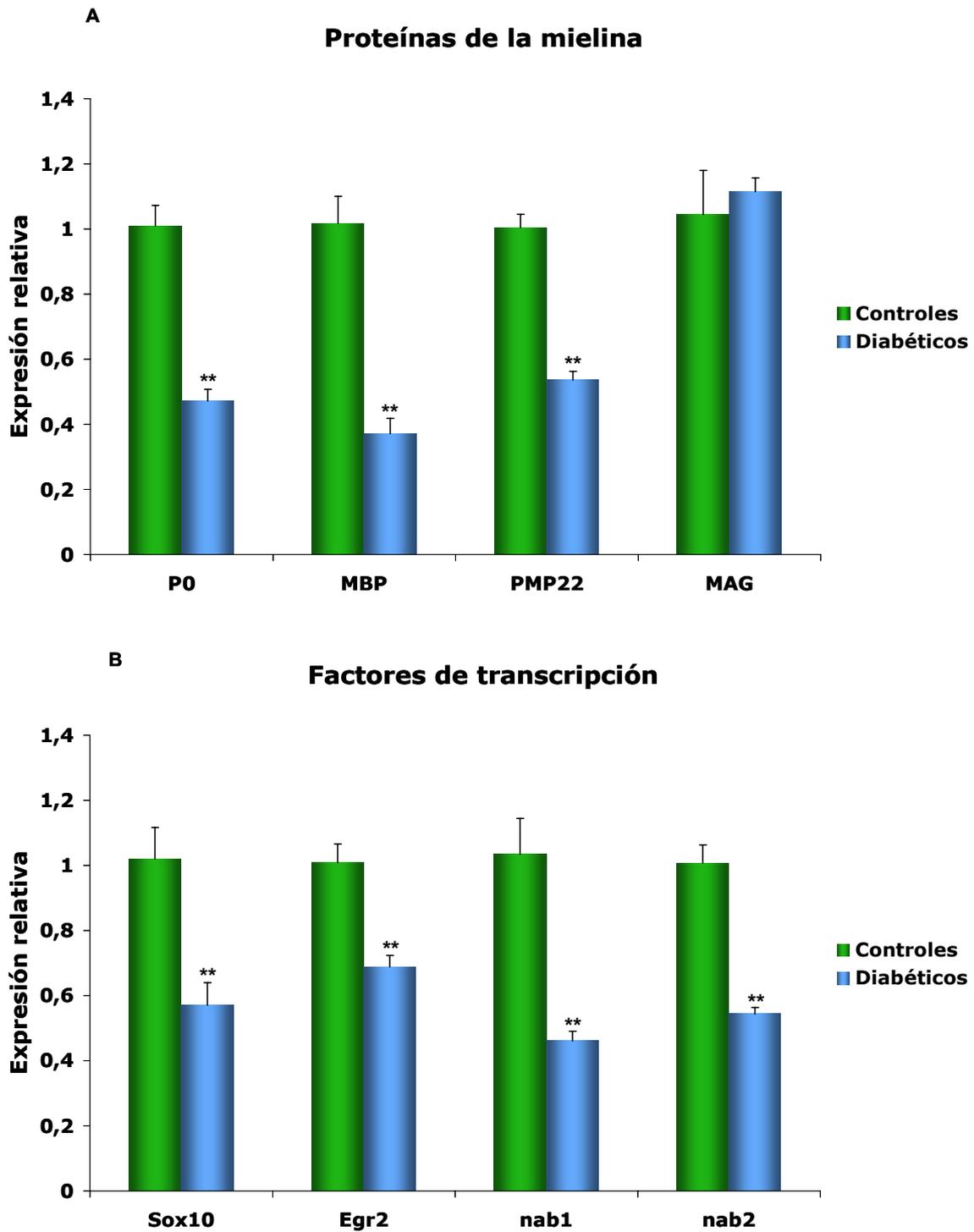
Tras los resultados que se habían obtenido en los ICR adultos, se analizó el efecto de la hiperglucemia en ratones de 18 días de edad, cuando está descrito el pico en la expresión de la principal proteína de la mielina P0 (LeBlanc *et al.*, 2007). Este modelo nos permitiría valorar mejor la alteración de los nervios debida a la hiperglucemia ya que estamos en los primeros estadios de la mielinización del animal y con la mielina aún sin compactar definitivamente como encontramos en los adultos.



**Figura 28.** Representación de la glucemia de los animales utilizados y sacrificados a P18. (n=12 controles, n=11 diabéticos)

Los resultados de las glucemias de la **Figura 28** nos muestran como todos los animales diabéticos utilizados estaban por encima de 300mg/dl.

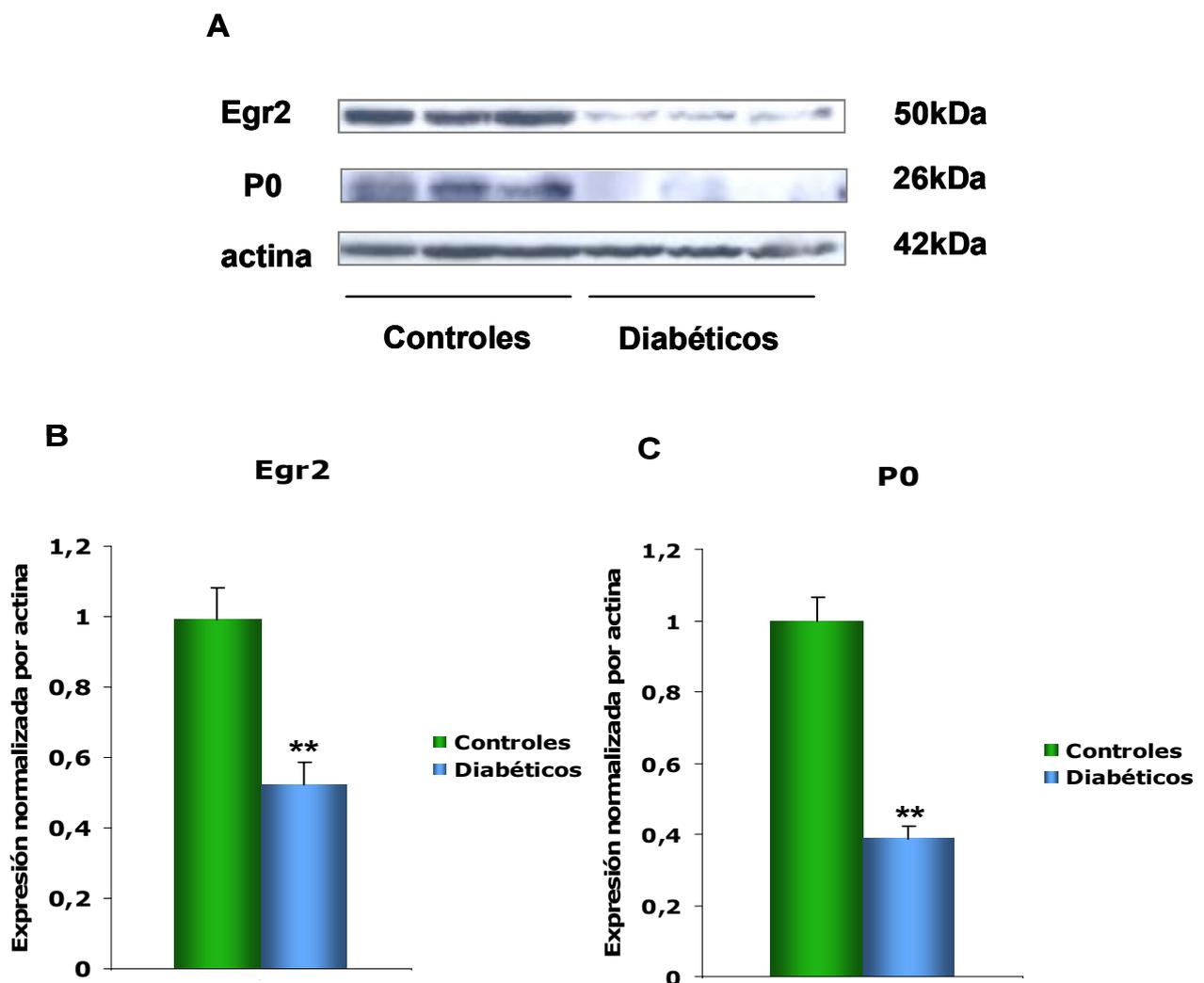
Se realizaron los mismos experimentos en los nervios ciáticos de estos animales que en los ICR adultos y se analizó por real-time PCR tanto la expresión de las proteínas de la mielina como la de los factores de transcripción.



**Figura 29. A)** Expresión de las principales proteínas de la mielina, **B)** Expresión de los principales factores de transcripción implicados en mielinización, ambos análisis realizados en nervios ciáticos de ratones ICR sacrificados a P18. (n=6 para controles, n=6 para diabéticos; \*\*p<0,01)

En cuanto a las proteínas de la mielina, los resultados de la **Figura 29** nos muestran una disminución alrededor del 50% estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) en P0, MBP y PMP22, sin embargo no se observan cambios en la expresión de MAG. Para los factores de transcripción, Sox10, Egr2 y sus proteínas correguladoras nab1 y nab2, también se observa una disminución en la expresión entre el 40 y el 50%, estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ).

Además, se analizó por WB la expresión de Egr2 y P0 en estos animales.



**Figura 30.** Análisis de la expresión de Egr2 y P0 en ICR controles y diabéticos a P18. **A)** WB de Egr2, P0 y actina representativo con muestras de animales controles y diabéticos, **B)** Representación de la densitometría de las bandas de Egr2 normalizadas por las de actina, **C)** Representación de la densitometría de las bandas de P0 normalizadas por las de actina.

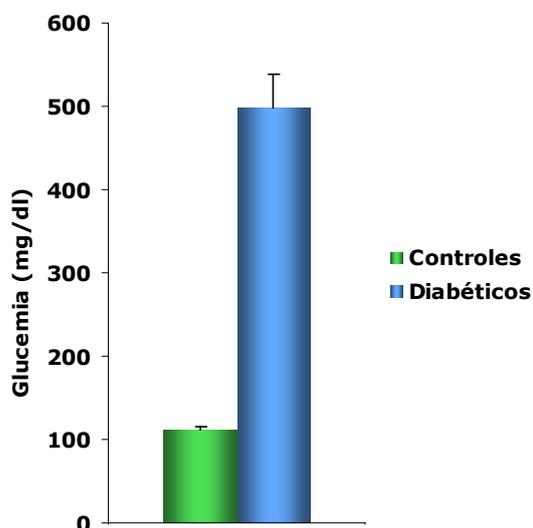
(n=6 para controles, n=5 para diabéticos; \*\* $p < 0,01$ )

Los resultados del análisis de la expresión de proteínas de la **Figura 30**, nos muestran una disminución en un 50% para Egr2 y del 60% para P0, estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) en los animales diabéticos respecto a los controles.

Estos datos nos confirman que la hiperglucemia está afectando tanto las proteínas de la mielina como los factores de transcripción implicados en mielinización, disminuyendo su expresión tanto a nivel de mRNA como de proteína.

### 2.3. Análisis del efecto de la hiperglucemia en nervios ciáticos de ratones NOD

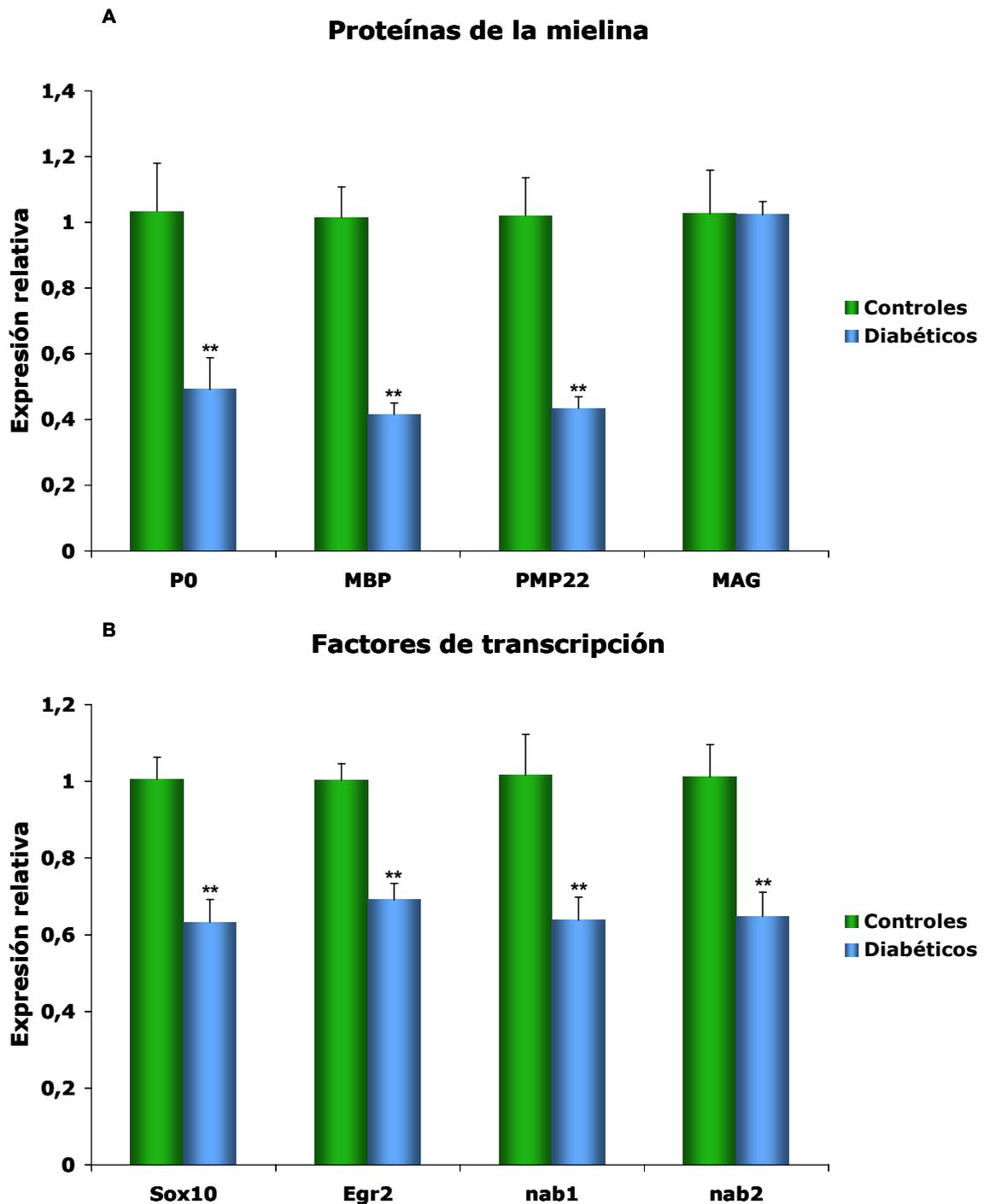
Para acabar de corroborar los resultados que habíamos obtenido en los ratones a los que se les había inducido la diabetes experimental mediante STZ, se utilizaron ratones NOD, un modelo ampliamente utilizado de diabetes tipo I puesto que desarrollan espontáneamente la enfermedad.



**Figura 31.** Representación de la glucemia de los animales NOD en el momento de la eutanasia. (n=12 controles, n=11 diabéticos)

Como se puede observar en la **Figura 31**, los ratones NOD diabéticos adultos en el momento de la eutanasia, presentaban glucemias superiores a 500mg/dl.

Se analizó mediante real-time PCR la expresión de las proteínas de la mielina y de los factores de transcripción implicados en mielinización en los nervios ciáticos de ratones NOD controles y diabéticos.



**Figura 32. A)** Expresión de las principales proteínas de la mielina, **B)** Expresión de los principales factores de transcripción implicados en mielinización, ambos análisis realizados en nervios ciáticos de ratones NOD controles y diabéticos. (n=6 para controles, n=5 para diabéticos; \*\*p<0,01)

Los resultados de la **Figura 32** nos muestran una disminución alrededor del 50%, estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) para las proteínas de la mielina P0, MBP y PMP22 en los nervios ciáticos de los ratones NOD diabéticos respecto a los controles. Para los factores de transcripción Sox10, Egr2, nab1 y nab2 también se observó una disminución estadísticamente significativa alrededor del 40% ( $p < 0,01$ ).

No se observaron diferencias significativas para la expresión de Egr2 mediante western blot (datos no mostrados), debido posiblemente a que la diabetes no se puede sincronizar en estos animales y por tanto existe variabilidad en el tiempo de diabetes en un mismo grupo.

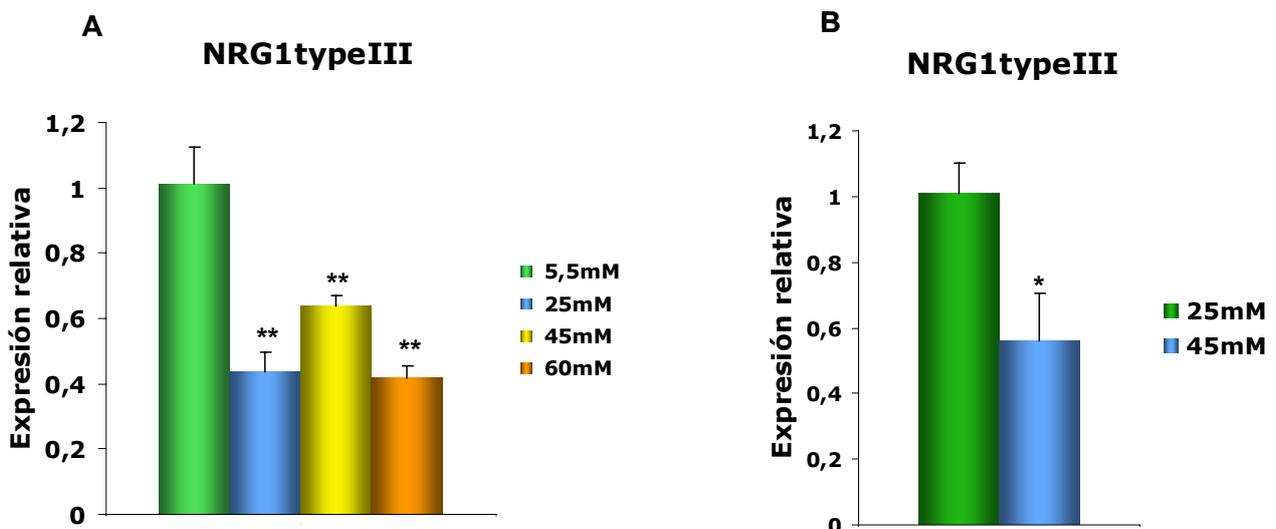
### **3. EFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA EN NEURONAS SENSORIALES Y MOTORAS**

#### **3.1. Estudio de la expresión de NRG1<sup>typelll</sup> en neuronas sensoriales *in vitro***

Los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de la neuropatía diabética todavía no son claros, se acepta que la patogenia de esta enfermedad es consecuencia de diversos factores, pero como hemos comentado anteriormente hay controversia en qué tipos celulares están afectados y en cómo y cuando empezaría el desarrollo de la complicación.

Según los resultados que hemos obtenido hasta ahora, sugerirían que las desencadenantes de la complicación podrían ser las SC, puesto que ya se muestran cambios significativos a semana 1 de hiperglucemia. No obstante, está descrito que para la mielinización es indispensable la correcta funcionalidad de la vía NRG1-ErbB y que ésta a su vez está implicada en la expresión directa de las proteínas de la mielina y de los factores de transcripción Sox10 y Egr2.

Los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias nos brindaban una herramienta útil para estudiar cómo estaba afectada la expresión de NRG1typeIII tras la incubación con diferentes concentraciones de glucosa. Se realizaron los mismos experimentos que con las proteínas de la mielina y los factores de transcripción y se estudió la expresión mediante PCR cuantitativa en los cocultivos a los que se había realizado *starving* antes de incubar con hiperglucemia, y el análisis en los cocultivos sólo con un aumento en 20mM de glucosa durante 24h.



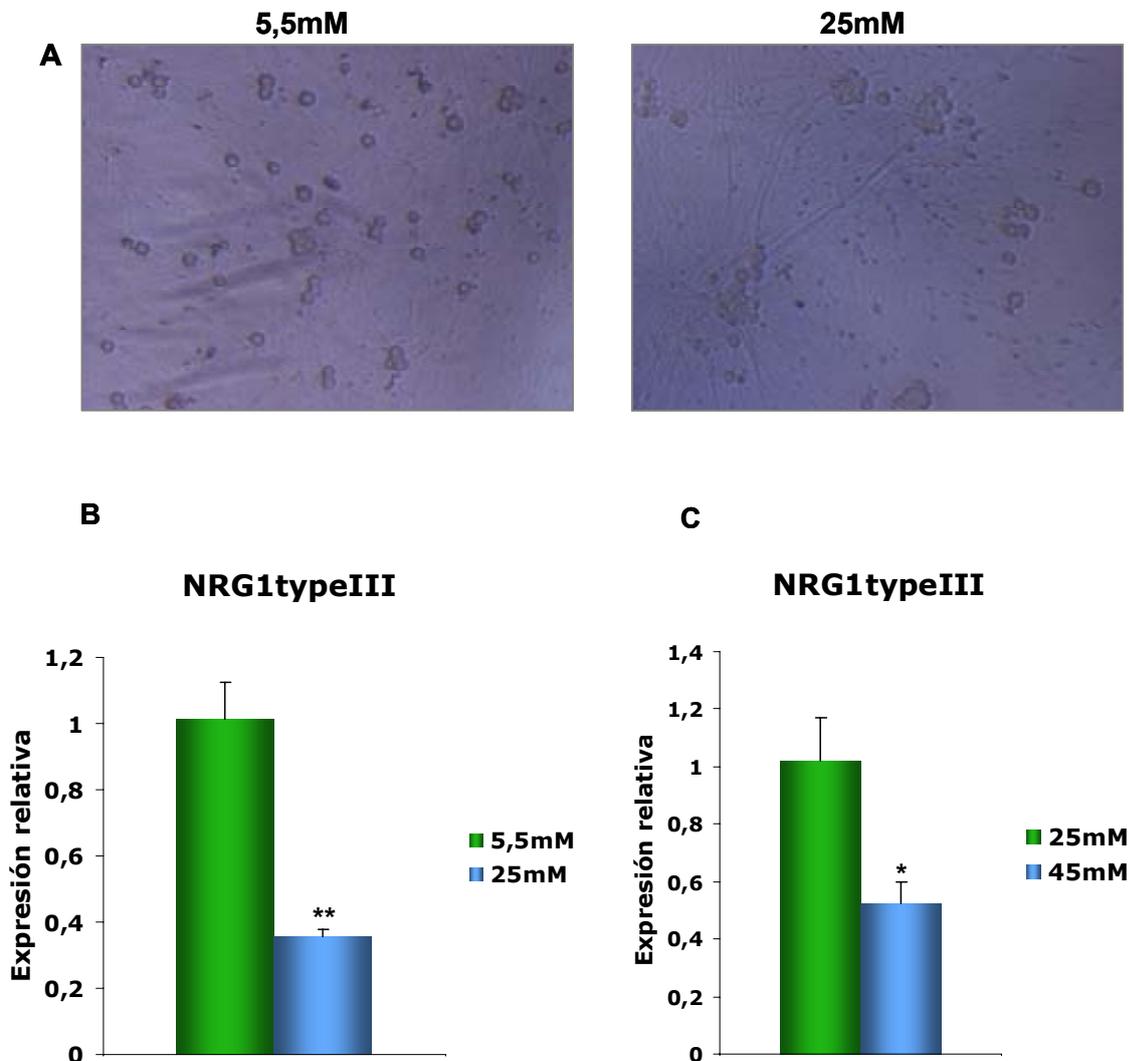
**Figura 33.** Expresión de NRG1typeIII en cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias con **A)** Diferentes concentraciones de glucosa con un *starving* previo, **B)** Incrementando la concentración de glucosa en 20mM.

(n=6 en A) y n=3 en B); \*p<0,05, \*\*p<0,01)

Los resultados de la **Figura 33** nos indican una disminución estadísticamente significativa de al menos el 40% (p<0,01) en la expresión de NRG1typeIII con las diferentes concentraciones de glucosa utilizadas después del *starving*. Además, al analizar la cantidad de mRNA de esta proteína tras el incremento de glucosa en 20mM también podemos observar una disminución estadísticamente significativa del 40% (p<0,05).

Al realizar cultivos de neuronas sensoriales purificados, eliminando todas las células mitóticas, incluyendo los fibroblastos y las SC, podíamos analizar el efecto de la glucosa en estos cultivos purificados y ver cómo estaba afectada la

expresión de NRG1typeIII sin tener ningún efecto derivado de las SC. Realizamos el mismo análisis en los cultivos purificados de neuronas sensoriales donde estudiamos la expresión del factor promielinizante después de aumentar la glucosa con o sin previo *starving*.



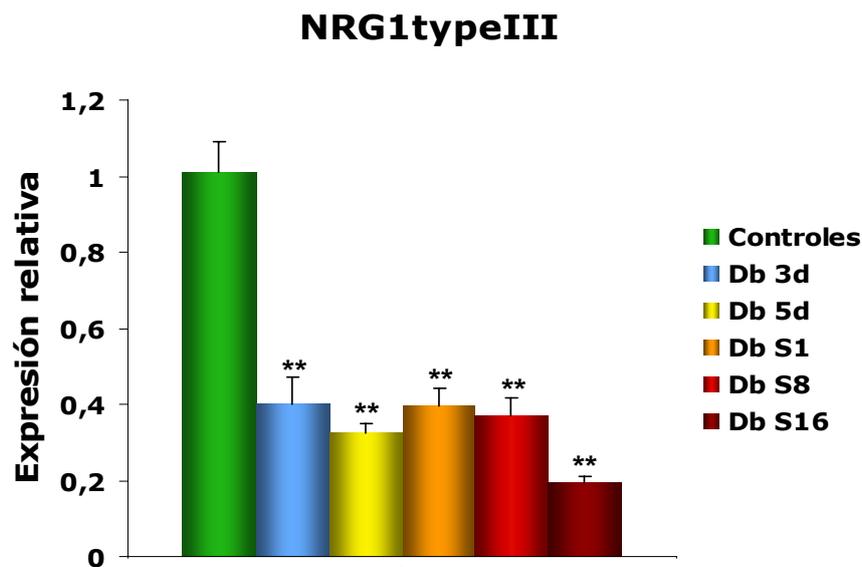
**Figura 34. A)** Imágenes de las neuronas purificadas, tomadas a 100X aumentos. Expresión de NRG1typeIII en cultivos purificados de neuronas sensoriales primarias incubados con **B)** Diferentes concentraciones de glucosa con un *starving* previo, **C)** Incrementando la concentración de glucosa en 20mM. (n=6 en A) y n=3 en B); \*p<0,05, \*\*p<0,01)

En los resultados de la **Figura 34** se puede observar como al igual que en los cocultivos de SC con neuronas sensoriales, en los cultivos purificados también detectamos una disminución en la expresión de NRG1typeIII,

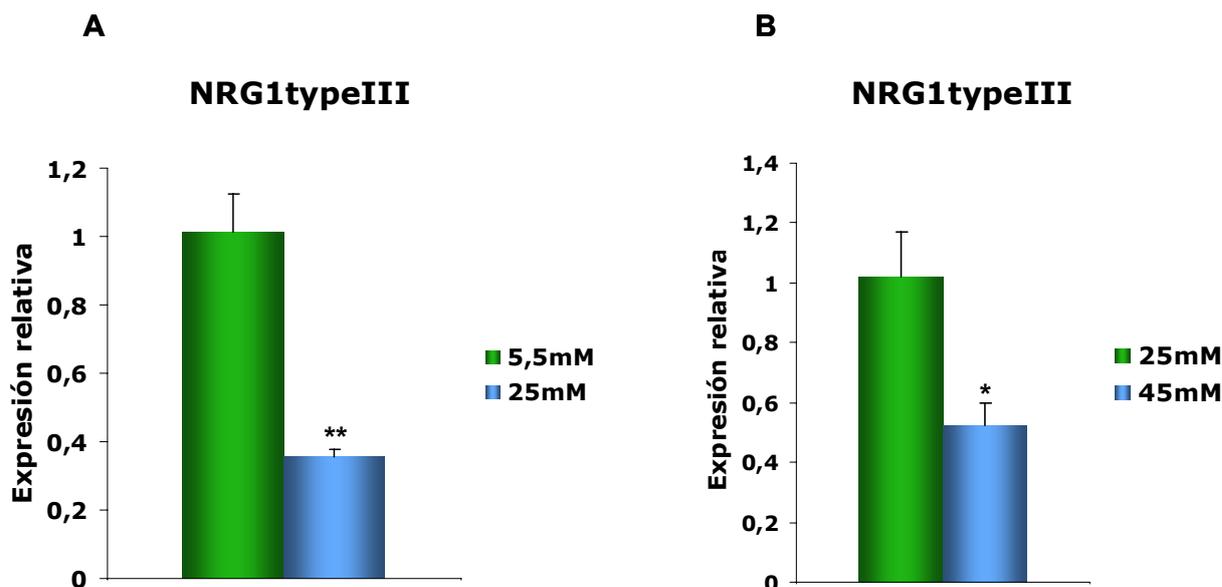
alrededor del 60%, estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) con el aumento de la concentración de glucosa posterior al *starving* y del 50% al incrementar la glucosa en 20mM ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. Estudio de la expresión de NRG1typeIII en neuronas sensoriales *in vivo*

Después de los resultados obtenidos *in vitro*, en los que había una clara disminución en la expresión de NRG1typeIII correlacionando con la disminución observada en las proteínas de la mielina, decidimos analizar la expresión de NRG1typeIII en los ganglios de la raíz dorsal de los tres modelos animales dónde habíamos estudiado la expresión de las proteínas de la mielina en nervios ciáticos, en ICR adultos y a P18 y en ratones NOD.



**Figura 35.** Expresión de NRG1typeIII en los ganglios de la raíz dorsal en ratones ICR  
Db: diabéticos, d: día, S: semana, tiempo después de la última inyección de STZ.  
(n=5 para todos los puntos excepto Db 3d donde n=4; \*\* $p < 0,01$ )



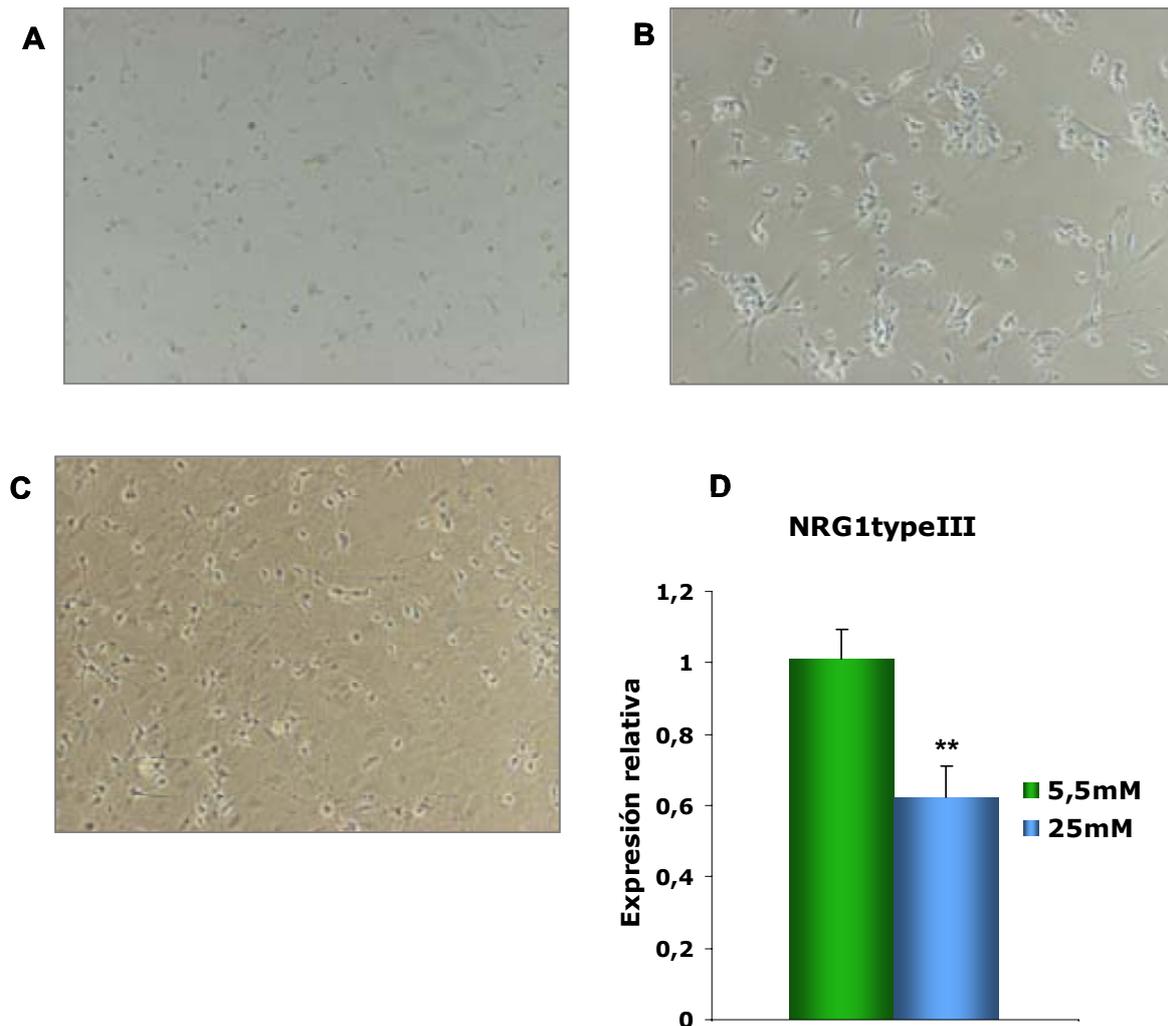
**Figura 36.** Expresión de NRG1typeIII en los ganglios de la raíz dorsal en ratones **A)** ICR jóvenes (n=6 para controles y diabéticos; \*\*p<0,01) y **B)** NOD (n=6 para controles y n=5 para diabéticos; \*p<0,05)

En los ratones ICR adultos (**Figura 35**), los resultados nos indican que NRG1typeIII ya está estadísticamente disminuida en los ganglios de la raíz dorsal alrededor del 60% a día 3 después de la inducción de la diabetes experimental mediante STZ, niveles que observamos se mantienen al menos hasta semana 16 que es el último punto estudiado (p<0,01). En cuanto al análisis de la proteína promielinizante en ICR a P18 y en NOD (**Figura 36**), los resultados de la PCR cuantitativa también mostraban igual que para los ICR adultos, una disminución estadísticamente significativa sobre el 60% en los ratones ICR jóvenes y en NOD, respecto los animales controles (p<0,01 y p<0,05).

### 3.3. Estudio de la expresión de NRG1typeIII en neuronas motoras *in vitro*

En la neuropatía diabética existen alteraciones no sólo en los componentes sensoriales sino también en componentes motores, de ahí que tras haber observado la alteración en la expresión de NRG1typeIII en las

neuronas sensoriales debido al incremento en la concentración de glucosa en nuestros modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, analizamos si se detectaban cambios a nivel de médula espinal en las neuronas motoras. Para los estudios *in vitro* se utilizaron cultivos de neuronas motoras primarias (MN), a los que una vez totalmente confluentes, se les realizó *starving* y posteriormente incubación con 5,5 y 25mM de glucosa.



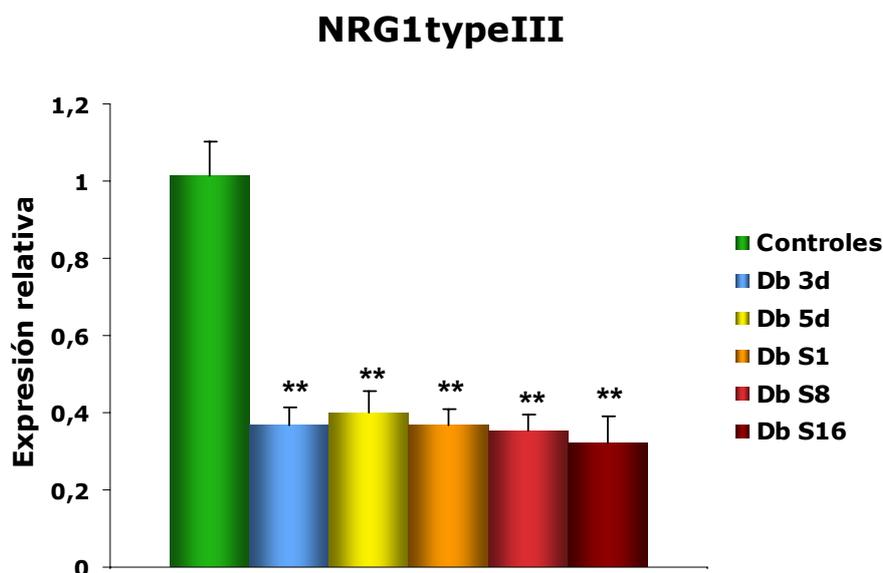
**Figura 37. A-C)** Imágenes de los cultivos de motoneuronas primarias a 100X aumentos a diferentes días de cultivo. **A)** 1 día, **B)** 3 días, **C)** 5 días. **D)** Expresión de NRG1typeIII en motoneuronas primarias cultivados con 5,5 y 25mM de glucosa.

(n=4 para cada punto; \*\*p<0,01)

La PCR cuantitativa de la **Figura 37**, mostraba una disminución estadísticamente significativa del 40% en la expresión de NRG1typeIII en las motoneuronas, indicándonos que este tipo celular que también estaba afectado ( $p < 0,01$ ).

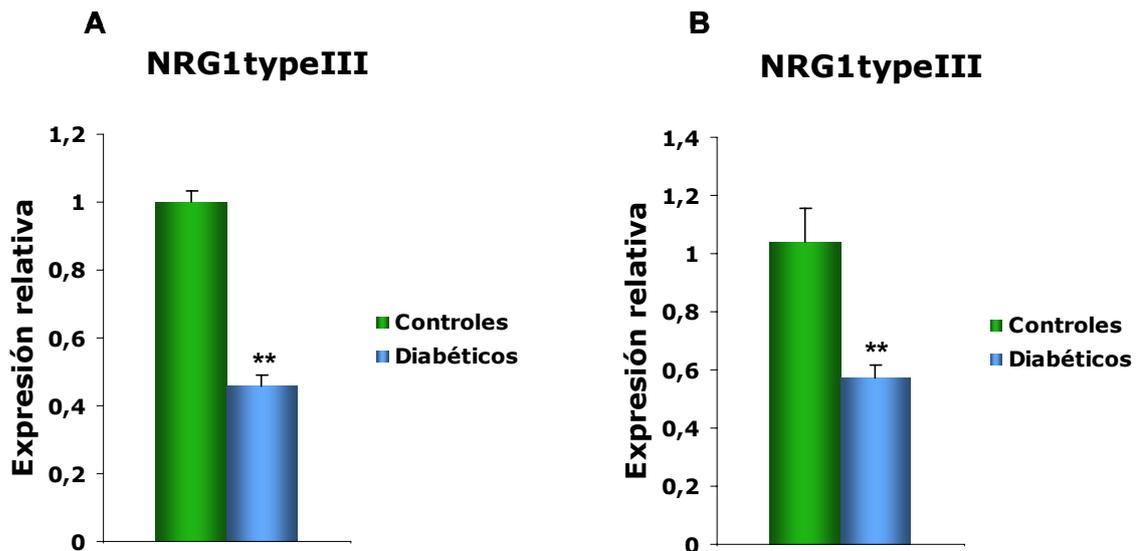
### 3.4. Estudio de la expresión de NRG1typeIII en neuronas motoras *in vivo*

Tras los resultados obtenidos en los cultivos primarios de motoneuronas analizamos la expresión de NRG1typeIII en las médulas espinales en los tres modelos animales estudiados.



**Figura 38.** Expresión de NRG1typeIII en la médula espinal de ratones ICR adultos.

Db: diabéticos, d: día, S: semana, tiempo después de la última inyección de STZ. (n=5 para controles, n=4 para Db 3d, n=5 para Db 5d, n=6 para Db S1, n=6 para Db S8 y n=6 para Db S16; \*\* $p < 0,01$ )



**Figura 39.** Expresión de NRG1typeIII en la médula espinal de ratones

**A)** ICR a P18 (n=6 para controles y diabéticos;  $p < 0,01$ ), **B)** NOD (n=6 para controles y n=8 para diabéticos;  $**p < 0,01$ )

En los resultados obtenidos del análisis de la expresión de NRG1typeIII en las muestras de médula espinal en los ratones ICR adultos (**Figura 38**) se puede observar una disminución estadísticamente significativa alrededor del 65% ya a día 3 después de la inducción de la diabetes experimental que se mantiene al menos hasta semana 16 ( $p < 0,01$ ). En ICR jóvenes y NOD (**Figura 39**), la disminución también es estadísticamente significativa y se encuentra sobre el 60% y 40% respectivamente ( $p < 0,01$ ).

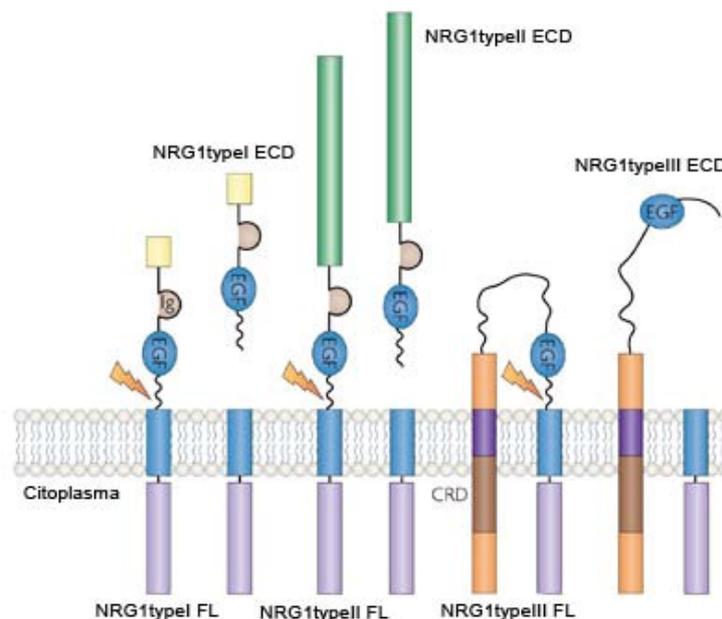
#### 4. PRODUCCIÓN Y FUNCIONALIDAD DE VECTORES VIRALES CON NRG1

Recapitulando los resultados obtenidos hasta este punto, habíamos observado una alteración en las SC tanto *in vitro* como *in vivo* en condiciones de hiperglucemia afectando la expresión de las proteínas de la mielina y de los principales factores de transcripción relaciones con mielinización. Esta afectación se correlacionaba perfectamente con una disminución de

NRG1typelll en las neuronas tanto *in vitro* como *in vivo*, en todos los modelos de diabetes tipo I que habíamos estudiado.

Como prueba de concepto, testamos si la administración de NRG1typelll en nuestro modelo de neuropatía diabética mediante vectores virales de terapia génica era capaz de revertir los cambios observados en estos animales.

Obtuvimos a través del Dr. Gabriel Corfas las secuencias codificantes para los tres tipos de NRG1, typel, typell y typelll, tanto en la forma completa, (FL), como sólo con el dominio extracelular (ECD) y que codifica para la proteína ya procesada por el sitio de corte que reconocen las proteasas (Ver **Figura 40**). Todas las secuencias tenían un His-tag en 3' para facilitar su inmunodetección, puesto que los anticuerpos existentes no reconocen eficientemente las proteínas. Se realizaron todos los pasos de clonaje tal y como está indicado en el apartado de Materiales y Métodos, hasta obtener los plásmidos correspondientes para la producción de los vectores virales.

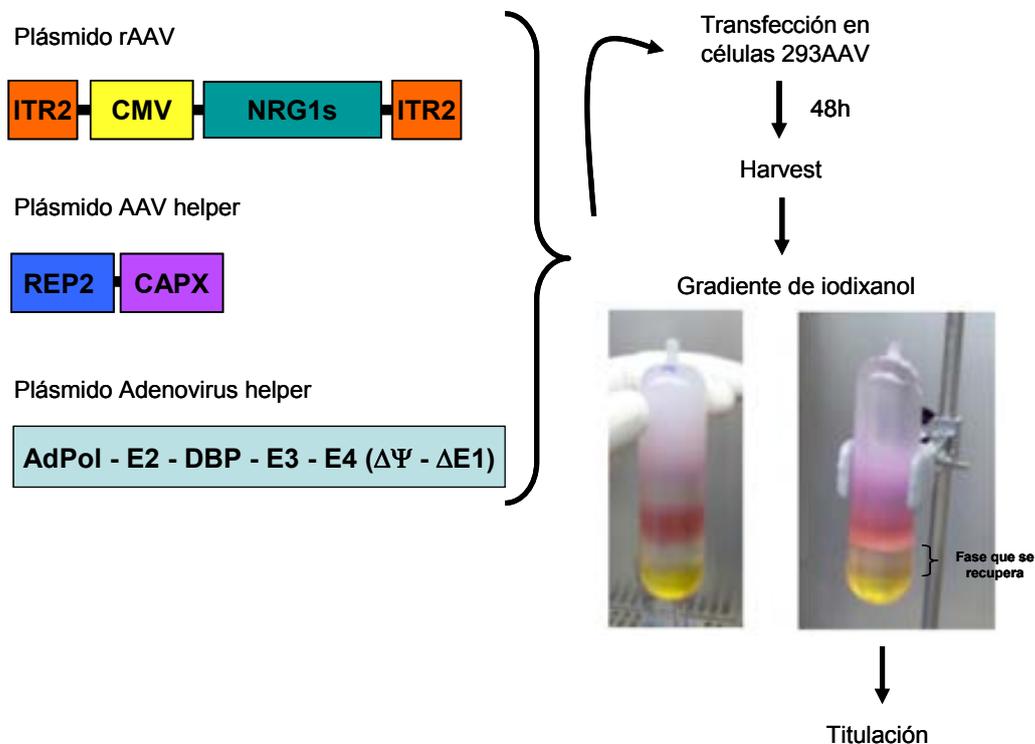


**Figura 40.** Representación de las proteínas clonadas en los vectores virales.  
Adaptación de (Mei and Xiong, 2008).

#### 4.1. Producción de los vectores virales con NRG1

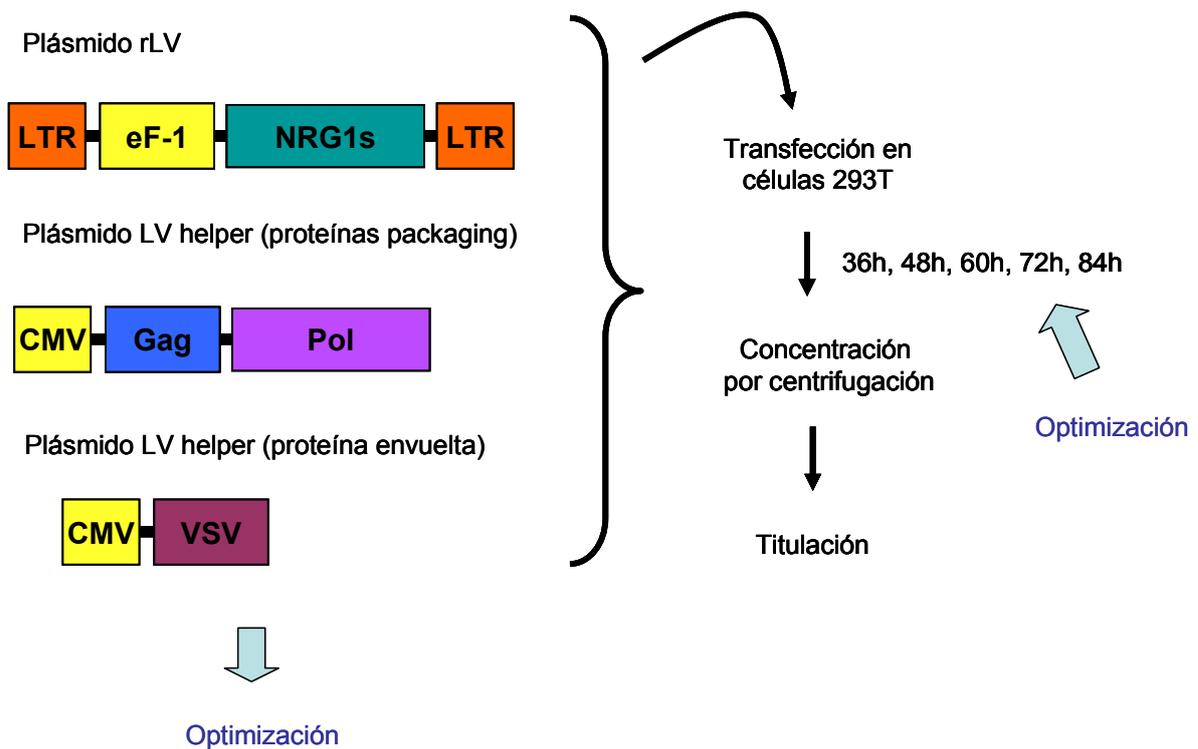
Con la finalidad de testar los vectores virales con los genes de NRG1 tanto *in vitro* para infectar los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias como *in vivo* en nuestro modelo animal de neuropatía diabética, se generaron las construcciones correspondientes para la producción de vectores lentivirales y adenoasociados. El objetivo era administrar AAV *in vivo* ya que permiten una transducción a largo plazo y con tropismo exclusivamente neuronal, sin embargo la transducción de las células primarias sólo se había descrito eficientemente *in vitro* con lentivirus, por lo que decidimos también producir estos vectores.

Los vectores adenoasociados con las secuencias codificantes para las NRG1s ECD y FL fueron producidos por la Unidad de Producción de Vectores del CBATEG (Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica), el protocolo utilizada está detallado en Materiales y Métodos y está resumido en la **Figura 41**.



**Figura 41.** Representación de los principales pasos utilizados en la producción de los vectores adenoasociados (AAV)

Para la generación de los vectores lentivirales, se optimizó la producción en dos puntos clave generando un lentivirus GFP para poder seguir la evolución mediante fluorescencia. El primero fueron las cantidades relativas de los plásmidos a transfectar y el segundo el tiempo de recolección después de la transfección de los plásmidos. En la **Figura 42** se puede ver un resumen de los pasos de producción seguidos para la producción de los vectores lentivirales con los transgenes codificando para las NRG1.



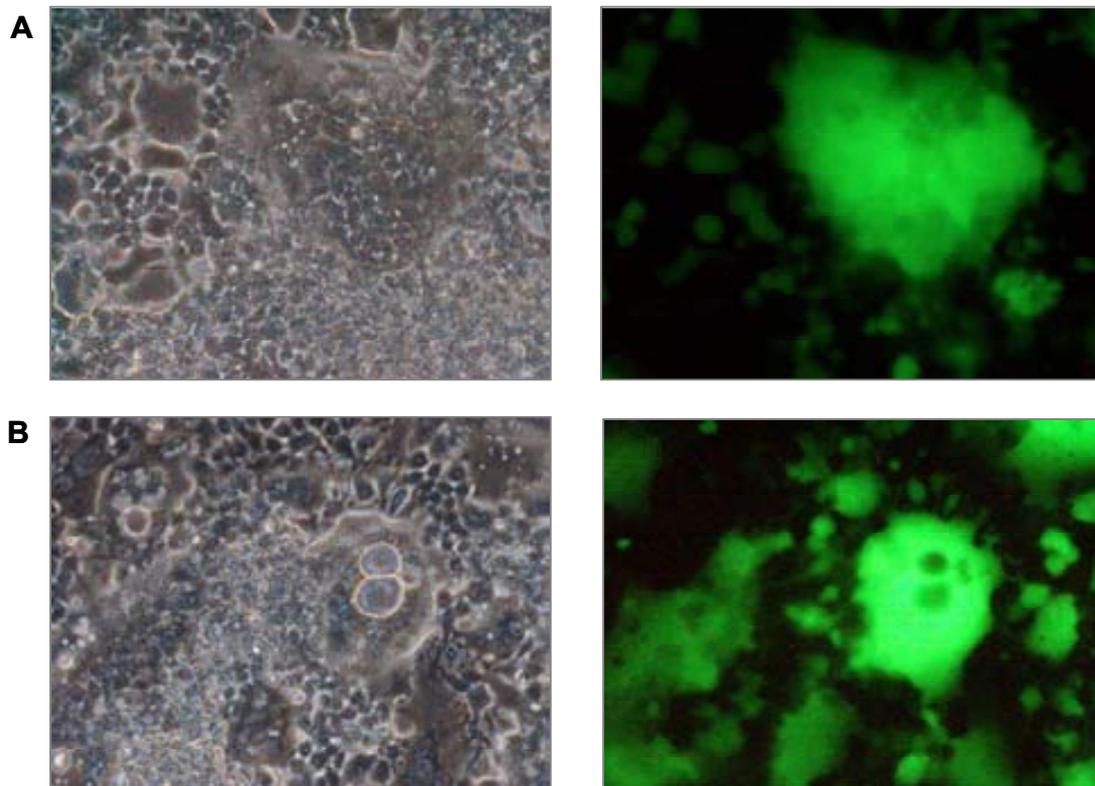
**Figura 42.** Representación de los principales pasos utilizados en la producción de los vectores lentivirales (LV)

Para el primer paso en la optimización de la producción se probaron dos condiciones de transfección:

1. 15µg de rLV, 10µg de LV helper con las proteínas de packaging y 5µg de LV helper con la proteína de la envuelta.

2. 20 $\mu$ g de rLV, 15 $\mu$ g de LV helper con las proteínas de packaging y 5 $\mu$ g de LV helper con la proteína de la envuelta.

En el segundo paso de optimización, se recogió el sobrenadante a 24h, 36h, 48h, 60h, 72h y 84h. Estos sobrenadantes se concentraron y se titularon separadamente para conocer el título viral que estábamos obteniendo en cada tiempo de recolección.



**Figura 43.** Optimización en la producción de los vectores lentivirales. **A-B)** Imágenes de la formación de sincitios durante la producción de los vectores con las dos condiciones utilizadas, 60h después de la transfección, **A)** 15 $\mu$ g/10 $\mu$ g /5 $\mu$ g y **B)** 20 $\mu$ g /15 $\mu$ g /5 $\mu$ g. Las imágenes tomadas están a 100X aumentos.

Condición 15µg/10µg/5µg

	<b>TU/ml</b>	<b>TU totales</b>
<b>Sobrenadante 24h</b>	3,30E+06	3,30E+05
<b>Sobrenadante 36h</b>	3,60E+06	3,60E+05
<b>Sobrenadante 48h</b>	7,10E+06	7,10E+05
<b>Sobrenadante 60h</b>	5,70E+06	5,70E+05
<b>Sobrenadante 72h</b>	6,30E+06	6,30E+05
<b>Sobrenadante 84h</b>	3,60E+06	3,60E+05

Condición 20µg/15µg/5µg

	<b>TU/ml</b>	<b>TU totales</b>
<b>Sobrenadante 24h</b>	4,00E+06	4,00E+05
<b>Sobrenadante 36h</b>	2,80E+07	2,80E+06
<b>Sobrenadante 48h</b>	5,00E+07	5,00E+06
<b>Sobrenadante 60h</b>	3,30E+07	3,30E+06
<b>Sobrenadante 72h</b>	3,00E+07	3,00E+06
<b>Sobrenadante 84h</b>	2,10E+07	2,10E+06

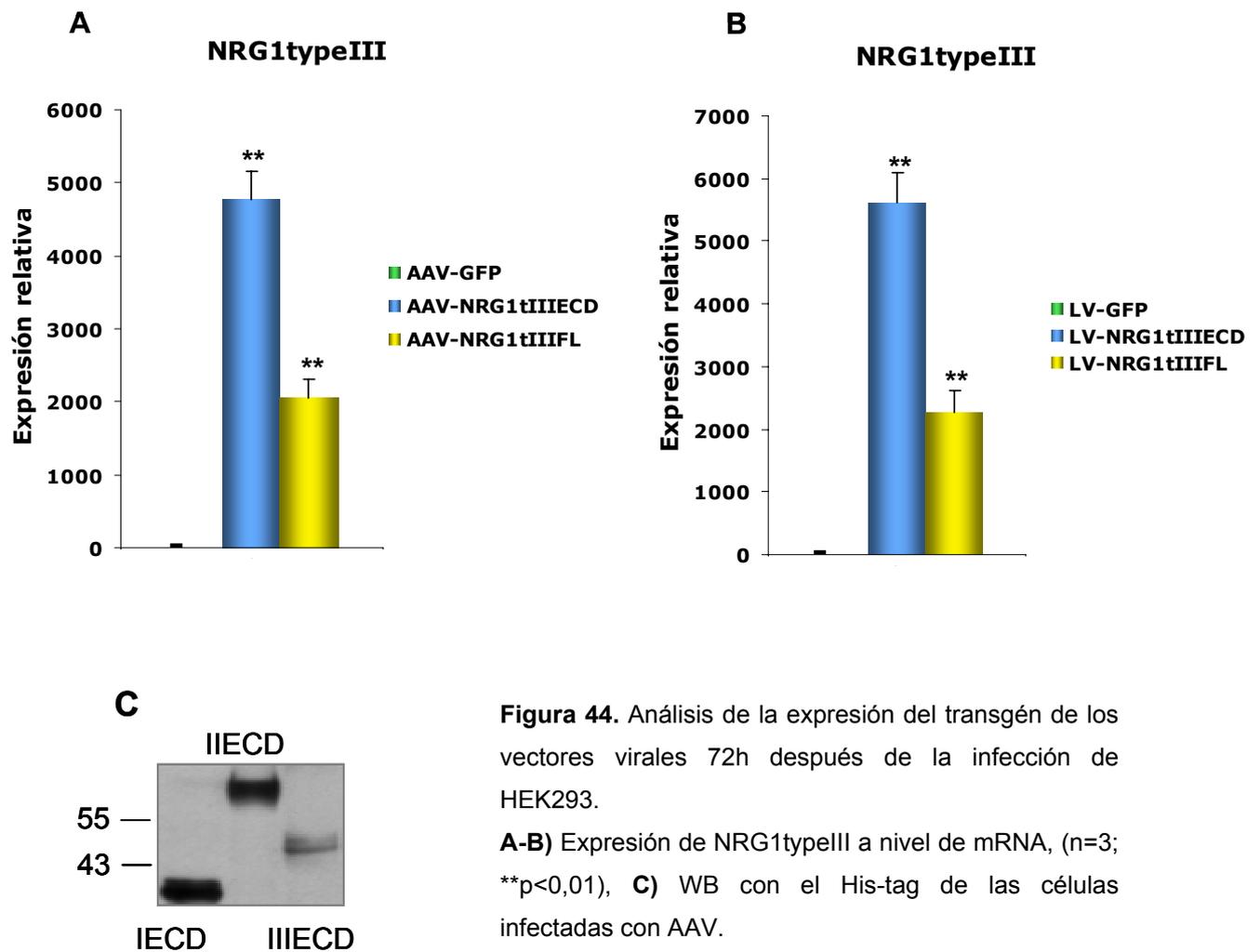
**Tabla 1.** Optimización en la producción de los vectores lentivirales. Cálculo de las TU/ml y TU totales para cada tiempo donde se recogió sobrenadante.

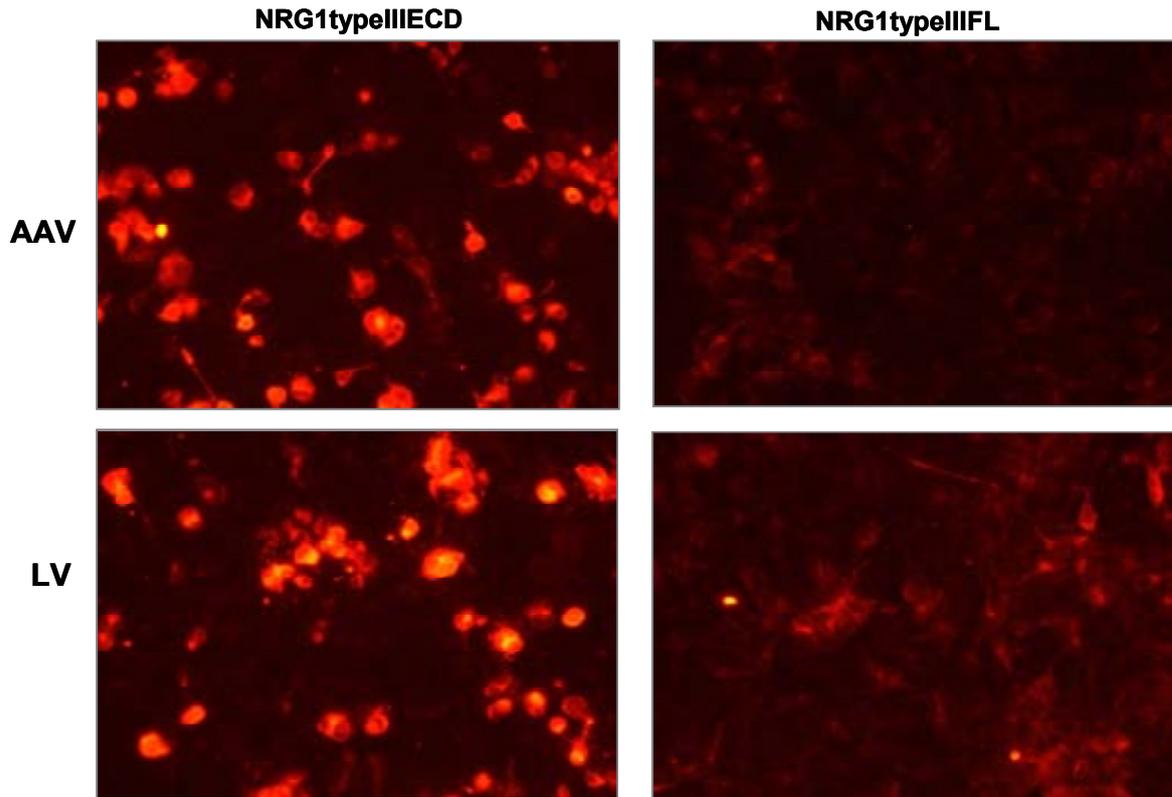
En la **Figura 43** se puede observar la formación de sincitios durante la producción de los vectores lentivirales debido a la fusogenicidad provocada por la proteína VSV y como la intensidad de la proteína GFP es mayor en la segunda condición utilizada. Al analizar las TU/ml y totales presentes en cada sobrenadante, también se pudo observar como en la segunda condición la recuperación es un logaritmo mayor que para la primera condición y que a 24h aún no se está produciendo una gran cantidad de vector lentiviral (**Tabla 1**).

Con estos resultados se procedió a la producción de los 6 vectores lentivirales con las secuencias codificantes para las NRG1s FL y ECD utilizando 20µg del plásmido rLV, 15µg del plásmido helper con las proteínas del packaging y 5µg del plásmido helper con la proteína de la envuelta. El sobrenadante se recogió a 36h, 48h, 60h, 72h y 84h.

## 4.2. Análisis de la funcionalidad de los vectores virales con NRG1

Una vez generados los vectores virales, se testó su funcionalidad. Se infectaron células HEK293, para analizar los niveles de expresión de mRNA y proteína.



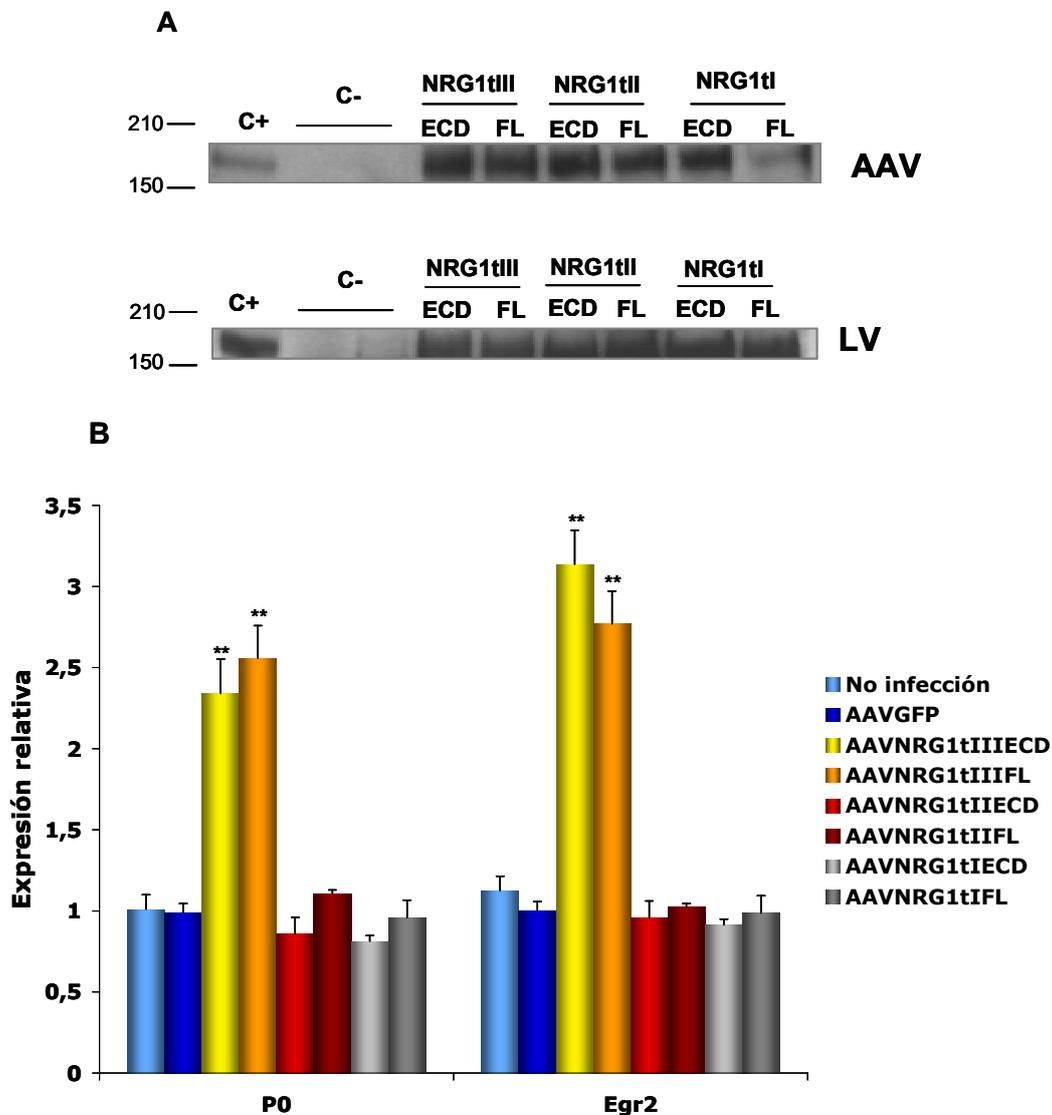


**Figura 45.** Análisis de la expresión del transgén de los vectores virales 72h después de la infección de HEK293. Inmunocitoquímica con el His-tag, en las células HEK293 infectadas con los dos tipos de vectores virales. Las imágenes están tomadas a 100X aumentos.

Los resultados en las **Figuras 44** y **45**, nos muestran que tanto los vectores adenoasociados como lentivirales expresan elevados niveles de mRNA y proteína para NRG1typeIII. Sin embargo, podemos observar como la proteína FL se expresa en menor cantidad tanto por mRNA como por inmunocitoquímica (**Figura 44A-B** y **Figura 45**). De hecho, mediante WB sólo se muestran las células infectadas con los vectores codificantes para las secuencias ECD ya que no se consiguió detectar expresión en las células transducidas con FL (**Figura 44C**). Todos estos datos sugerían que la construcción FL parecía ser menos estable que las ECD.

Una vez demostrado que los vectores virales estaban expresando los transgenes, infectamos células 293 con los vectores virales durante 48h y posteriormente las cocultivamos con SC primarias, para comprobar si las secuencias NRG1 eran bioactivas. Para ello analizamos la fosforilación del

receptor ErbB en SC primarias y además, si las construcciones con NRG1typeIII aumentaban la expresión de las proteínas de la mielina y de los factores de transcripción implicados en mielinización tal y como está descrito en el trabajo del grupo de Corfas (Chen *et al.*, 2006).



**Figura 46.** Análisis de la bioactividad de los vectores virales con NRG1 en cocultivos de HEK293 infectadas con los vectores y SC primarias.

A) WB para P-Tyr, B) Expresión de P0 y Egr2. En A) se utilizó como control positivo un cocultivo suplementado con NRG1 recombinante, y en ambos experimentos se utilizaron como controles negativos los cocultivos sin infectar e infectados con GFP.

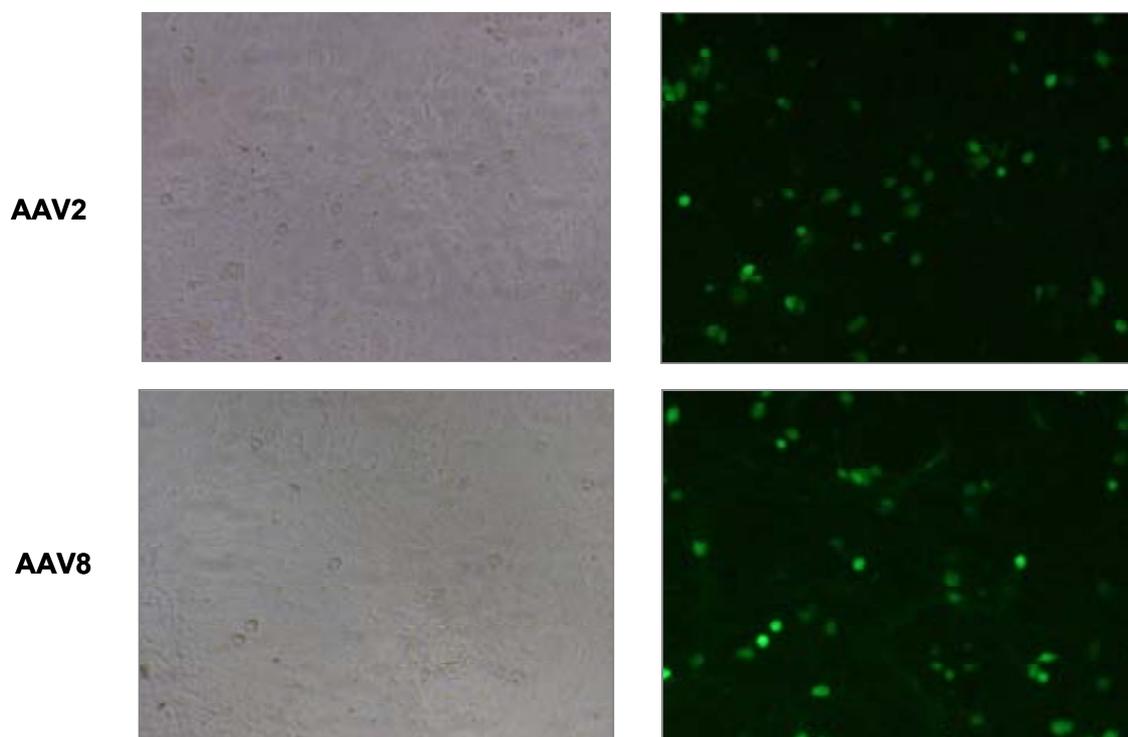
(n=3 en cada punto; \*\*p<0,01)

En la **Figura 46A** observamos como todas las construcciones son bioactivas ya que en el WB, podemos observar la fosforilación de una proteína de tamaño 185kDa, el mismo que presentan los receptores ErbB. Es decir,

independientemente de la menor expresión con las construcciones FL, la cantidad es suficiente para fosforilar y activar la vía de señalización.

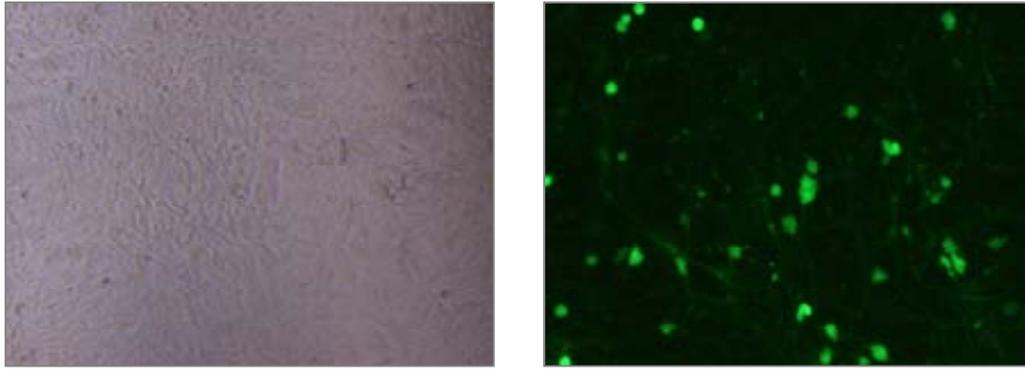
En la **Figura 46B** analizamos mediante PCR cuantitativa la expresión de P0 y Egr2 y los resultados obtenidos muestran que sólo cuando infectamos los cocultivos con NRG1typeIII hay un aumento en la expresión de estas proteínas. Se analizó también el efecto en otras proteínas de la mielina y en Sox10 y las correguladoras de Egr2, nab1 y nab2 pero la cantidad de mRNA que había en las muestras era demasiado pequeña y quedaba fuera del límite de detección lineal de la técnica por lo que no se pudieron conseguir resultados fiables.

De forma paralela, se realizaron ensayos de tropismo para analizar qué pseudotipo infectaba mejor las neuronas sensoriales. Se utilizaron 4 pseudotipos de AAV: AAV1, 2, 8 y rh10 con GFP para infectar los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias.



**Figura 47.** Análisis de la infectividad de los vectores AAV en los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias utilizando 15000 partículas físicas (PP)/célula. Imágenes a 100X aumentos, donde se puede observar la transducción de los cocultivos con AAV2 y AAV8.

AAVrh10

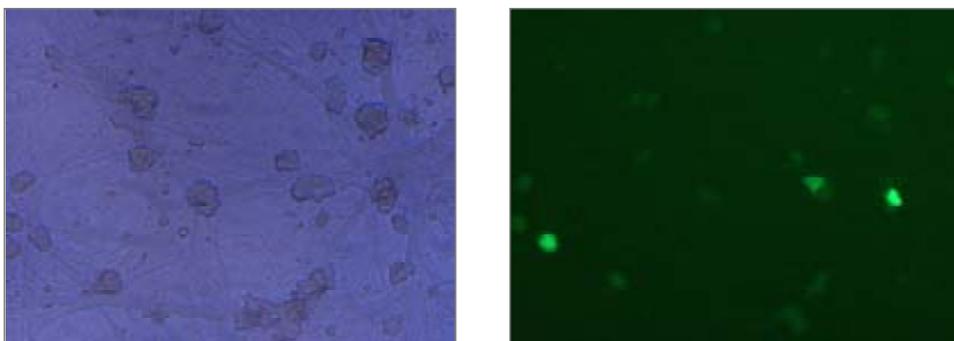


**Figura 48.** Análisis de la infectividad de los vectores AAV en los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias utilizando 15000 partículas físicas (PP)/célula. Imágenes a 100X aumentos donde se puede observar la transducción de los cocultivos con AAVrh10.

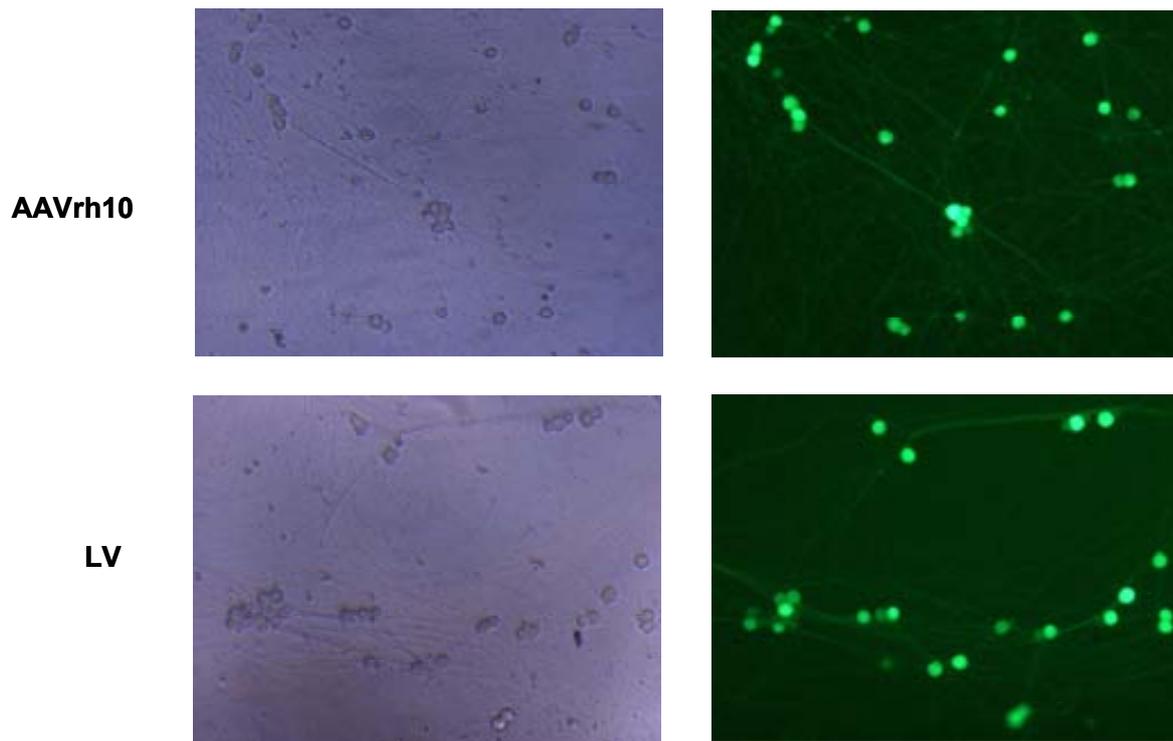
Los resultados de la infección nos muestran que al infectar los cultivos con las mismas condiciones para todos los serotipos (15000PP/cel), AAVrh10 infecta más eficientemente, seguido por AAV8 y AAV2 (**Figura 47 y 48**). AAVrh10 presenta más porcentaje de transducción neuronal, un 100% *versus* al 85% y 90% para AAV2 y AAV8 respectivamente. Además, la morfología de las células infectadas indica que los 3 serotipos están transduciendo principalmente neuronas. No se muestra ninguna foto de AAV1, puesto que no se observaba ninguna célula GFP<sup>+</sup> en los pozos de la infección.

En la **Figura 50** se muestran la infección de neuronas sensoriales purificadas con AAVrh10 y LV, para comparar los tipos de vectores virales y también se añadió AAV1 (**Figura 49**) para ver si podía transducir los cultivos purificados.

AAV1



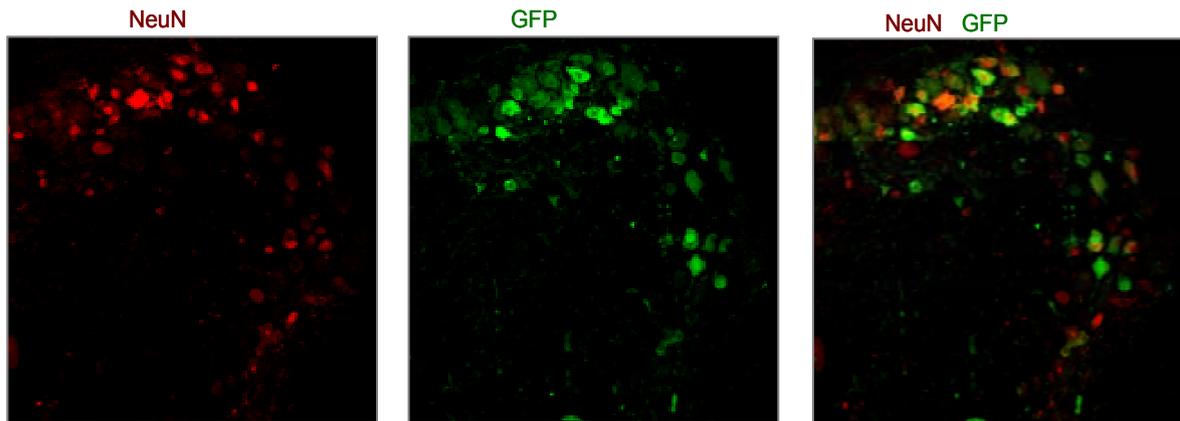
**Figura 49.** Análisis de la infectividad de los vectores AAV1 en cultivos purificados de neuronas sensoriales utilizando 10 *infection units* (IU)/célula. Imágenes a 100X aumentos.



**Figura 50.** Análisis de la infectividad de los vectores lentivirales y AAVrh10 en cultivos purificados de neuronas sensoriales utilizando 10 *transducing units* (TU)/célula para LV-GFP y 10 *infection units* (IU)/célula para AAVrh10-GFP. Todas las imágenes están a 100X aumentos.

Los resultados de la **Figura 49** nos muestran que AAV1 sólo es capaz de transducir el 50% de las neuronas en el cultivo purificado, y con una baja expresión del transgén. Tanto los vectores lentivirales como AAVrh10 infectan eficientemente los cultivos de neuronas sensoriales purificadas, con un 95 y 100% de transducción respectivamente, aunque si observamos las imágenes de la **Figura 50** nos muestran como el vector adenoasociado presenta una mayor intensidad en la señal de GFP que el vector lentiviral.

Posteriormente se infectaron cultivos organotípicos de la raíz dorsal con AAVrh10-GFP para determinar su capacidad de infectar neuronas sensoriales en un cultivo tridimensional.

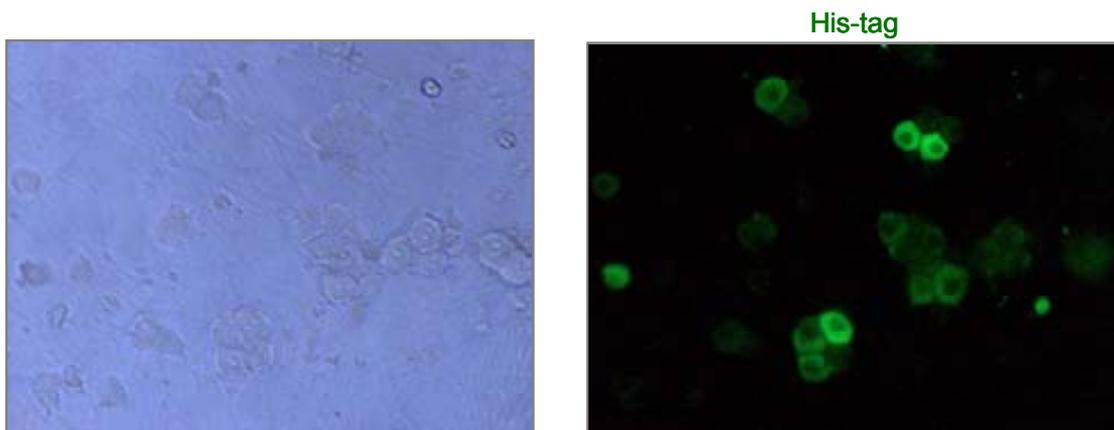


**Figura 51.** Transducción de cultivos organotípicos de ganglios de la raíz dorsal con AAVrh10-GFP ( $3 \times 10^9$  PP/ganglio). Las imágenes presentan una inmunohistoquímica con NeuN y la colocalización con las células GFP<sup>+</sup>.

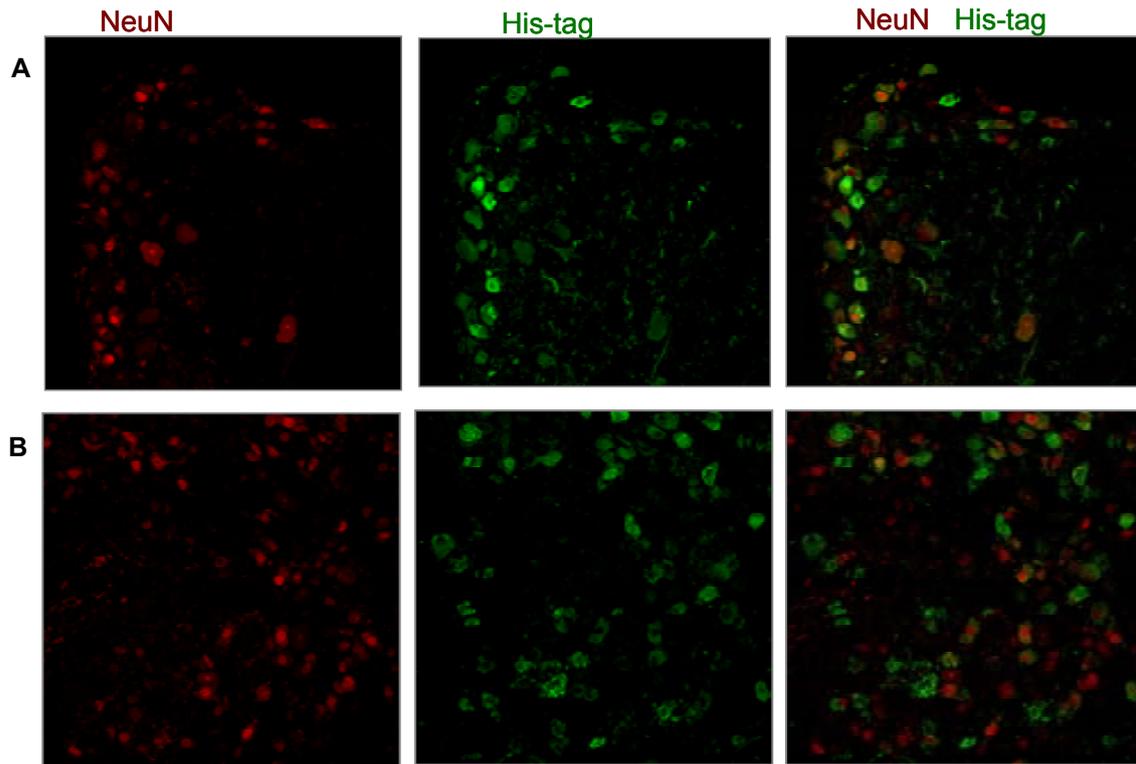
Todas las imágenes están a 200X aumentos.

Los resultados de la **Figura 51** nos muestran como AAVrh10 es capaz de transducir específicamente neuronas sensoriales en los ganglios de la raíz dorsal ya que observamos colocalización con NeuN, que marca específicamente este tipo celular.

Los resultados obtenidos con GFP, se confirmaron con AAVrh10-NRG1typeIII.



**Figura 52.** Transducción de neuronas sensoriales con AAVrh10-NRG1typeIII. Inmunocitoquímica para el His-tag que contienen el transgén de NRG1 en cultivos de neuronas sensoriales purificadas infectadas con 15000 PP/cell. Las imágenes están a 200X aumentos.



**Figura 53.** Transducción de neuronas sensoriales con AAVrh10-NRG1typeIII. Inmunohistoquímica de un cultivo organotípico de ganglio de la raíz dorsal con NeuN y la colocalización con las células His-tag<sup>+</sup>. **A)** Extremo del ganglio, **B)** Parte interna del ganglio. Todas las imágenes están a 200X aumentos.

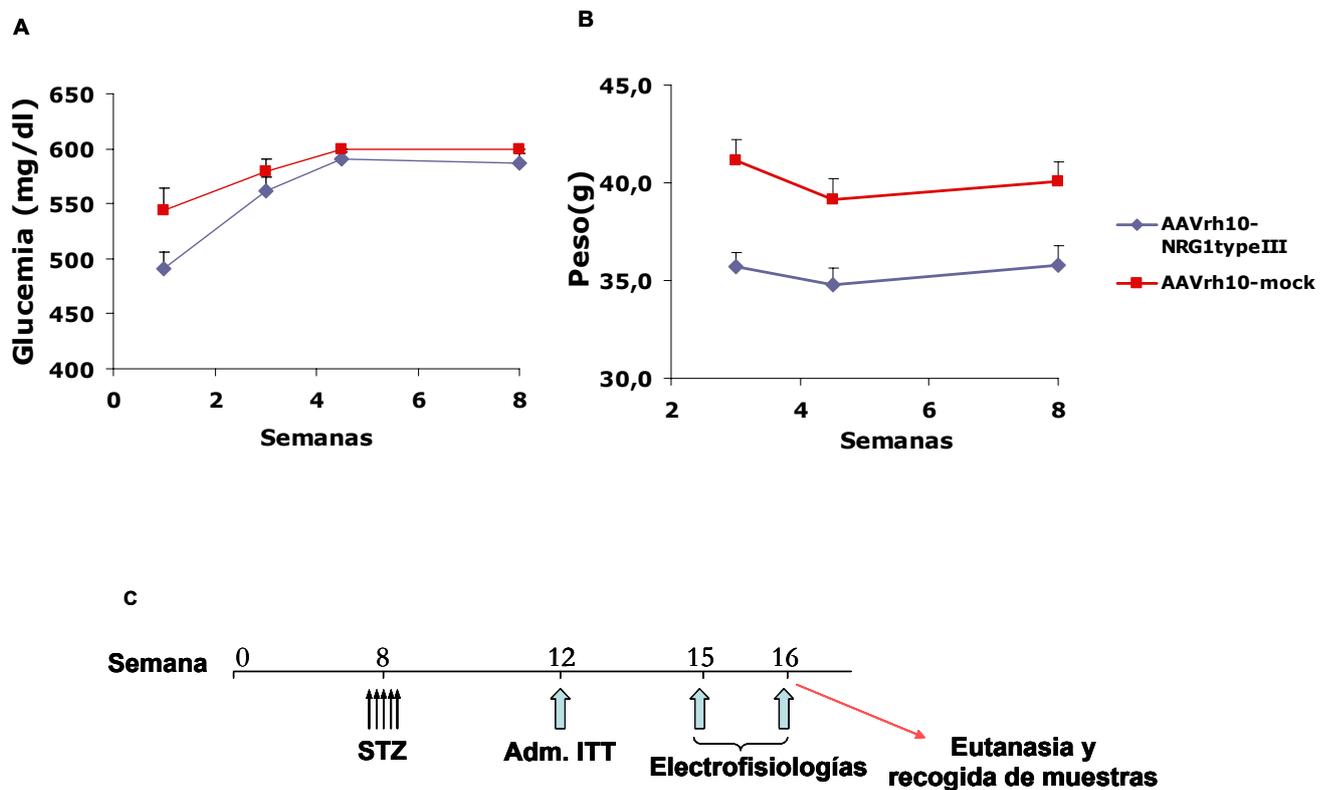
En los resultados de las inmunocitoquímicas (**Figura 52 y 53**) se puede observar que AAVrh10-NRG1typeIII transduce específicamente neuronas sensoriales tanto *in vitro* como *ex vivo*, tanto en la periferia que está en contacto directo con el medio de cultivo que contiene el vector (**Figura 53A**), como en la zona central del ganglio (**Figura 53B**), indicando que ha habido una difusión del vector dentro del tejido.

## 5. ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE AAVrh10-NRG1typeIII EN UN MODELO DE NEUROPATÍA DIABÉTICA

Estudios de nuestro grupo han demostrado que después de una inyección intratecal entre las vértebras L3 y L4 de los ratones con AAVrh10-GFP, se transducen eficientemente tanto neuronas sensoriales como motoras (Homs, 2010).

Para testar si la administración exógena de NRG1typeIII era capaz de recuperar las alteraciones moleculares demostradas en los ratones diabéticos administramos intratecalmente AAVrh10-NRG1typeIII en un modelo de ND.

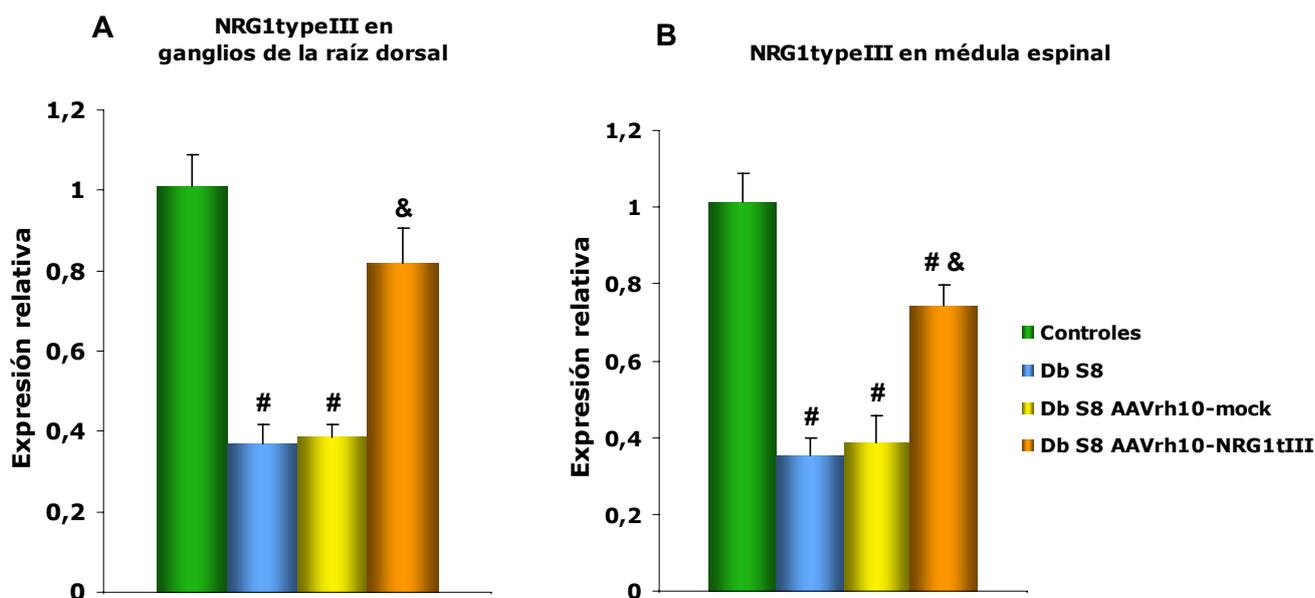
A continuación se esquematiza la evolución de las glucemias y pesos de los animales y el diseño experimental utilizado (**Figura 54**), donde se indujo la diabetes experimental mediante STZ y 4 semanas después se procedió a la inyección de los vectores virales. A día 24 y 31 después de la inyección se realizaron los análisis electrofisiológicos y finalmente se sacrificaron los animales.



**Figura 54. A-B)** Evolución de la glucemia y del peso en los animales utilizados (n=6 para AAVrh10-mock, n=16 para AAVrh10-NRG1typeIII), **C)** Esquema del diseño experimental utilizado en el ensayo de terapia génica con AAVrh10-NRG1typeIII en un modelo de neuropatía diabética.

### 5.1. Análisis de la expresión del transgén en los animales inyectados

Una vez sacrificados los animales, se procedió al estudio de la transducción por parte del vector adenoasociado. En primer lugar, se analizó la expresión del transgén mediante PCR cuantitativa tanto en ganglios de la raíz dorsal como en médula y se comparó tanto con los animales inyectados con el vector adenoasociado control como con ratones controles y diabéticos a semana 8 sin inyectar. También se analizó la expresión mediante WB en ganglios de la raíz dorsal y en médula espinal, y finalmente se realizaron inmunohistoquímicas en estos tejidos utilizando el His-tag presente en el transgén.

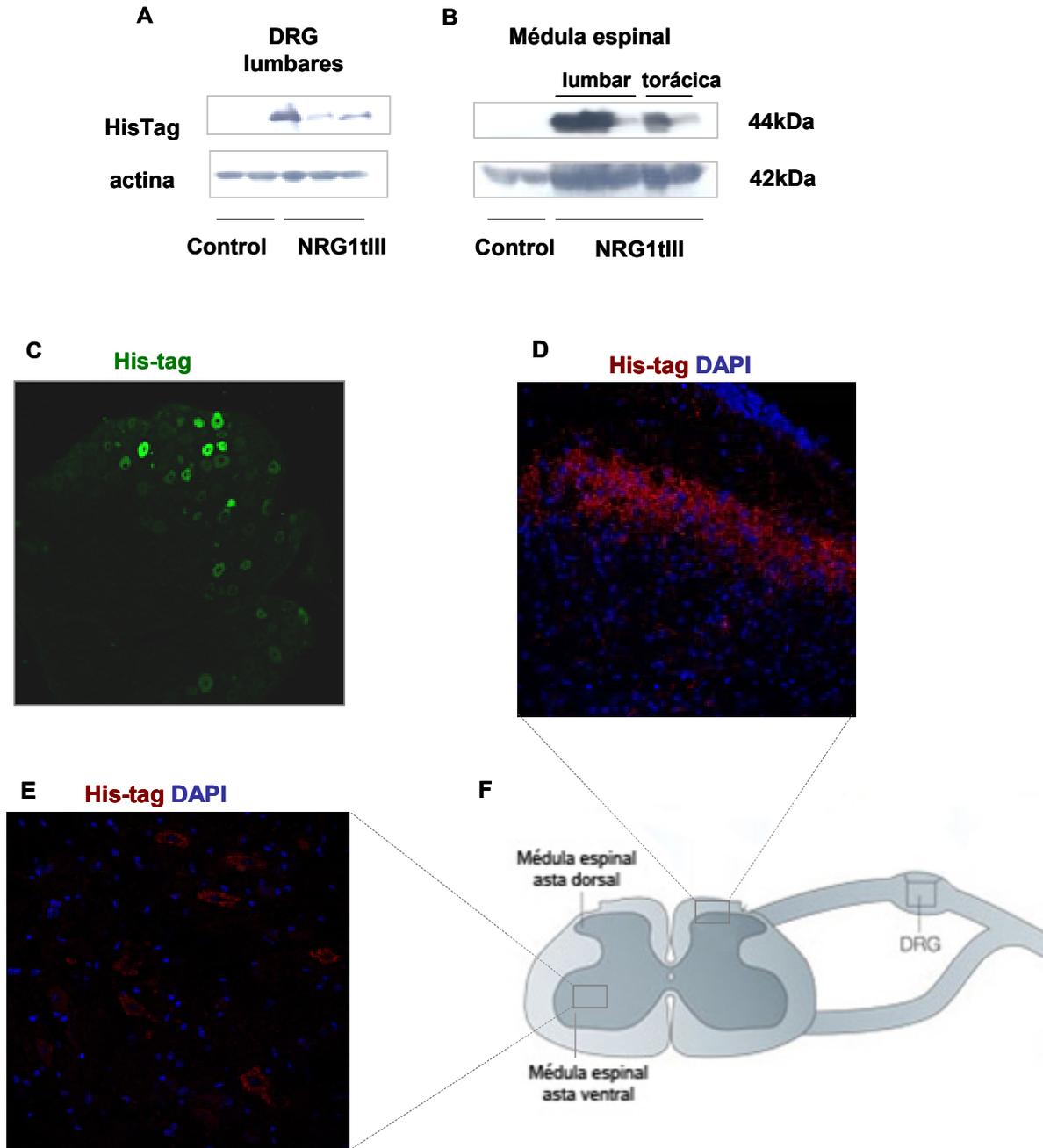


**Figura 55.** Análisis de la expresión del transgén en los animales inyectados con AAVrh10-mock y AAVrh10-NRG1typeIII.

Db: diabéticos, S: semana, tiempo después de la inducción de la diabetes.

**A)** Expresión del transgén en ganglios de la raíz dorsal mediante real-time PCR, **B)** Expresión del transgén en médula espinal mediante real-time PCR.

(n=5 para animales controles, n=6 para animales diabéticos S8, n=6 para animales inyectados con AAVrh10-mock y n=9 para animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII; #p<0,01 respecto controles, &p<0,01 respecto AAVrh10-mock y diabéticos S8)



**Figura 56.** Análisis de la expresión del transgén en los animales inyectados con AAVrh10-mock y AAVrh10-NRG1 type III. WB para His-tag en **A**) ganglios de la raíz dorsal (DRG) y **B**) médula espinal, **C**) Inmunohistoquímica para His-tag en ganglio de la raíz dorsal **D**) Inmunohistoquímica para His-tag y DAPI de la parte dorsal de una médula espinal **E**) Inmunohistoquímica para His-tag y DAPI de la parte ventral de una médula espinal. **F**) Esquema adaptado de (White *et al.*, 2005). Imágenes tomadas a 200X aumentos.

Al analizar los resultados obtenidos en los experimentos de real-time (**Figura 55**), podemos observar como en ganglios de la raíz dorsal, la expresión de NRG1typeIII en los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII alcanza el 80% respecto al total presente en los animales controles. Este incremento es estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ) respecto los animales diabéticos de S8 y los inyectados con AAVrh10-mock. En cuanto a la expresión en médula espinal, en los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII, ésta alcanza el 60% respecto a los animales controles, por lo que los niveles siguen estando significativamente disminuidos ( $p < 0,01$ ) respecto estos animales, pero respecto a los animales diabéticos e inyectados con AAVrh10-mock el aumento es estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ).

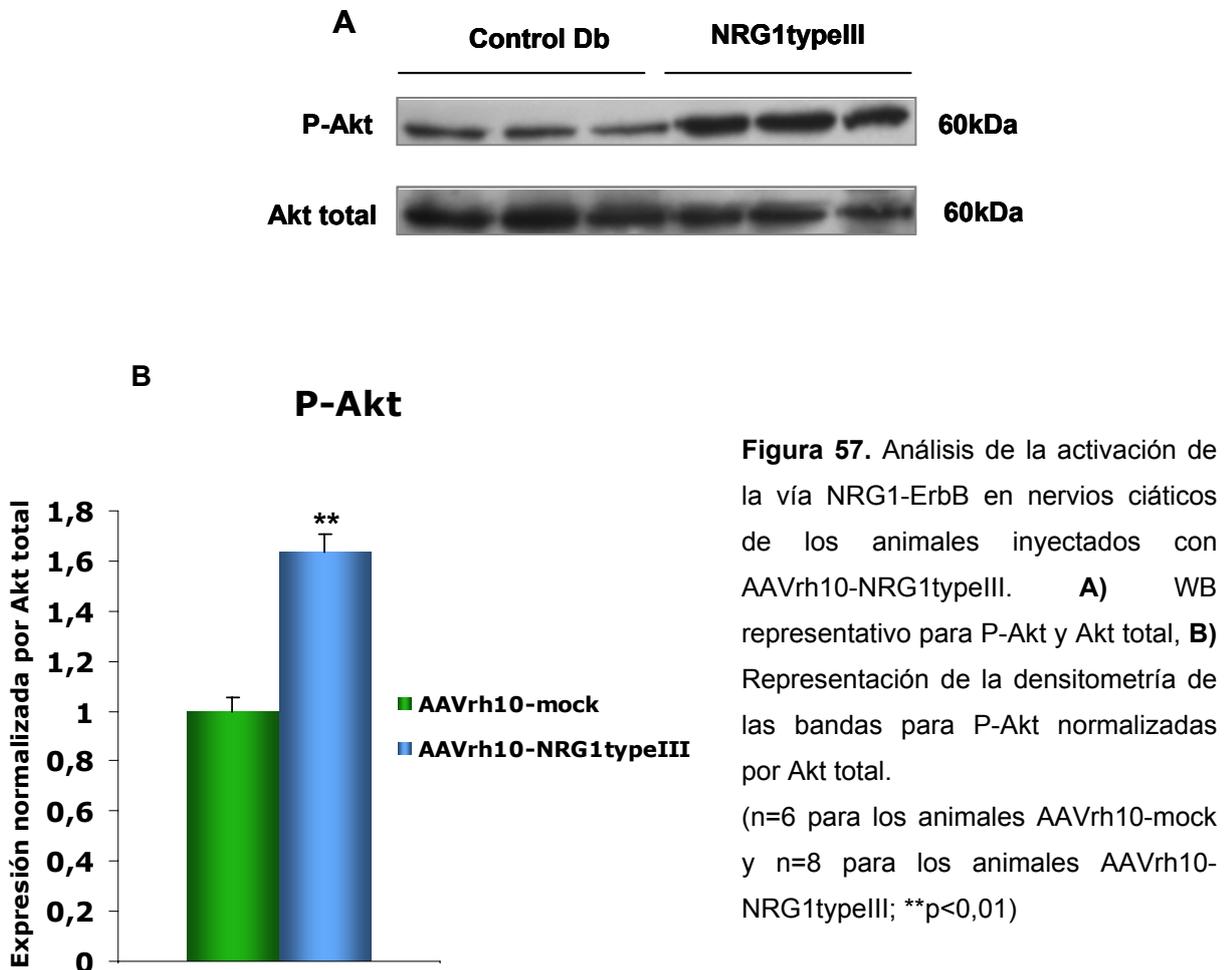
Los resultados de los WB y las inmunohistoquímicas con el His-tag (**Figura 56**), nos indican la presencia del transgén en los ganglios de la raíz dorsal y también en la médula espinal. En las secciones de ganglios de la raíz dorsal, la morfología de las células transducidas nos indica claramente que se trata de neuronas sensoriales. En los cortes de médula espinal, en la parte dorsal podemos observar el marcaje de todos los axones que están entrando en la médula espinal desde los ganglios de la raíz dorsal (**Figura 56D y F**) y en la parte ventral donde se sitúan las neuronas motoras, las células His-tag<sup>+</sup> tienen morfología típica de neuronas motoras (**Figura 56E y F**).

Los resultados mostrados, concuerdan con los obtenidos en nuestro grupo, donde se ha caracterizado exhaustivamente el patrón de transducción de AAVrh10 y tanto en ganglios de la raíz dorsal como en médula espinal infecta exclusivamente neuronas (Homs, 2010).

### **5.2. Análisis del efecto de NRG1typeIII sobre los nervios ciáticos en los animales diabéticos**

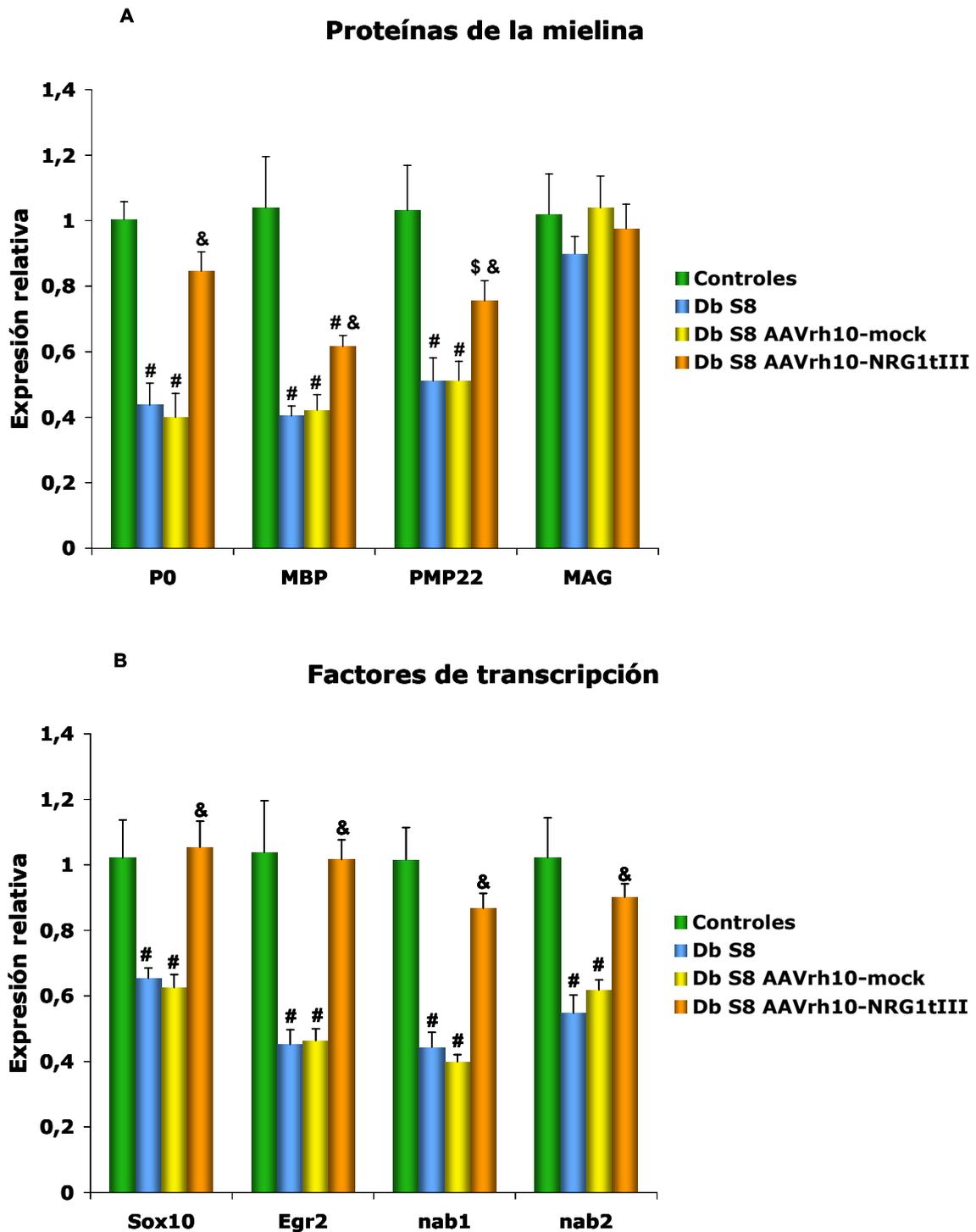
Una vez demostrada la expresión elevada de NRG1typeIII tanto en los ganglios de la raíz dorsal como en médula espinal, se analizaron los nervios ciáticos de los animales inyectados para averiguar si se había activado la

señalización mediante los receptores ErbB en estas muestras vía PI3 quinasa y Akt (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1998).



Los resultados de la **Figura 57** nos muestran un aumento en la fosforilación de Akt en los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII respecto a los animales controles y nos están indicando que la vía de señalización a través de los receptores ErbB presentes en los nervios ciáticos está activada.

A continuación, se analizaron las proteínas de la mielina y los principales factores de transcripción que habíamos observado que presentaban una disminución en la expresión con la hiperglucemia.



**Figura 58.** Análisis de la expresión de diferentes genes en los nervios ciáticos de los animales inyectados con AAVrh10-mock y AAVrh10-NRG1typelll.

Db: diabéticos, S: semana, tiempo después de la inducción de la diabetes.

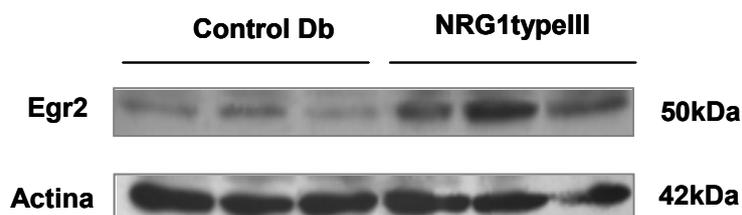
**A)** Expresión de las proteínas de la mielina, **B)** Expresión de los principales factores de transcripción implicados en mielinización.

(n=5 para animales controles, n=6 para diabéticos S8, n=6 para animales inyectados con AAVrh10-mock y n=9 para animales inyectados con AAVrh10-NRG1typelll; §p<0,05 respecto controles, #p<0,01 respecto controles, &p<0,01 respecto AAVrh10mock y diabéticos S8).

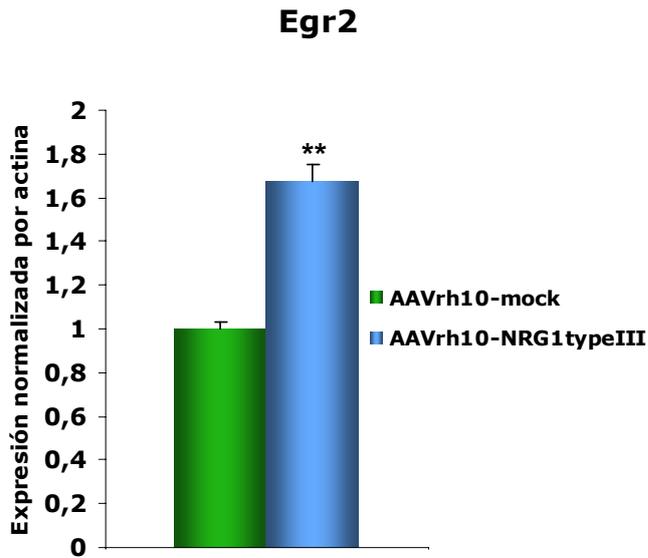
Los resultados para las proteínas de la mielina (**Figura 58A**) nos muestran como los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII presentan un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ) respecto a los animales diabéticos y a los inyectados con AAVrh10-mock. Si comparamos con los animales controles, el aumento de P0 es del 85%, para MBP del 60% y del 70% para PMP22, aunque siguen estando significativamente disminuidos respecto a los animales controles para MBP y PMP22 ( $p < 0,05$ ). No se observaron cambios para MAG.

En cuanto a los factores de transcripción que se han analizado, en la **Figura 58B**, se puede observar como para Sox10 y Egr2 los niveles en los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII están al mismo nivel que los controles, estando aumentados de manera significativa ( $p < 0,01$ ) respecto a los animales diabéticos e inyectados con AAVrh10-mock. Los niveles para las moléculas correguladoras de Egr2, nab1 y nab2, alcanzan unos niveles alrededor del 90% respecto a los animales controles, y también están aumentados de manera significativa ( $p < 0,01$ ) respecto a los animales diabéticos y a los inyectados con AAVrh10-mock.

Además, se analizó la expresión de Egr2 mediante WB en los nervios ciáticos de estos animales.



**Figura 59.** Análisis de la expresión de Egr2 en nervios ciáticos de los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII. WB representativo para Egr2 y actina.



**Figura 60.** Análisis de la expresión de Egr2 en nervios ciáticos de los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII. Representación de la densitometría de las bandas para Egr2 normalizadas por actina. (n=6 para los animales AAVrh10-mock y n=8 para los animales AAVrh10-NRG1typeIII; \*\*p<0,01)

Los resultados del WB (**Figura 59 y 60**) nos indican como a nivel de proteína los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII también presentan un aumento de 1,6 veces del factor para el transcripción Egr2 respecto al control, igual como habíamos observado mediante el análisis por PCR cuantitativa (**Figura 58B**).

### 5.3. Análisis electrofisiológicos y morfométricos de los animales diabéticos que sobreexpresan NRG1typeIII

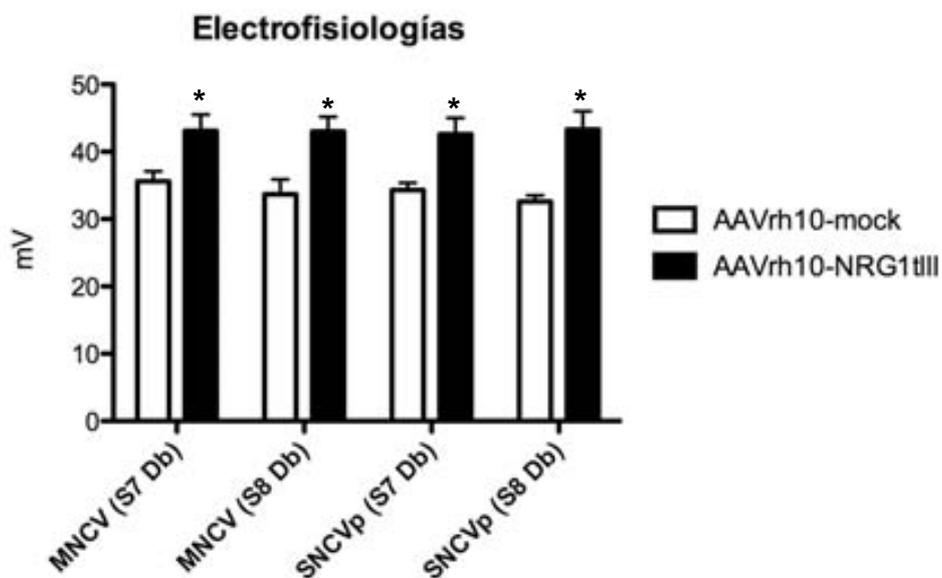
En colaboración con el grupo del Dr. Xavier Navarro, se realizaron tests electrofisiológicos a los ratones que se habían inyectado intratecalmente con AAVrh10. Se analizaron los diferentes parámetros electrofisiológicos en términos de velocidad de conducción, latencia y amplitud a día 24 y 31 postinyección de los vectores virales, es decir a semana 7 y 8 después de la inducción de la diabetes.

Tratamiento	AAVrh10-mock		AAVrh10-NRG1typelll	
(n)	(6)	(6)	(16)	(14)
Parámetro				
Semanas	7	8	7	8
<i>Tibialis ant. m.</i>				
Latencia (ms)	0.99 ± 0.04	1.12 ± 0.03	0.90 ± 0.03	0.88 ± 0.03
CMAP (mV)	52.6 ± 5.3	53.9 ± 6.6	58.6 ± 2.4	57.0 ± 2.4
<i>Plantar m.</i>				
Latencia (ms)	1.96 ± 0.10	2.09 ± 0.17	1.75 ± 0.04	1.72 ± 0.06
CMAP (mV)	6.42 ± 0.91	6.02 ± 1.19	6.92 ± 0.52	6.08 ± 0.43
MNCV (m/s)	35.6 ± 1.5	33.7 ± 2.2	43.1 ± 2.4*	43.0 ± 2.2*
<i>Nervio digital</i>				
Latencia (ms)	1.42 ± 0.03	1.54 ± 0.05	1.29 ± 0.02	1.30 ± 0.04
CNAP (µV)	26.5 ± 3.0	28.2 ± 3.5	29.6 ± 1.8	24.5 ± 2.1
SNCVp (m/s)	34.3 ± 1.1	32.6 ± 0.9	42.6 ± 2.4*	43.3 ± 2.7*
SNCVd (m/s)	28.4 ± 0.9	28.7 ± 1.2	29.7 ± 0.9	28.4 ± 1.7

**Tabla 2.** Los datos están expresados como las medias ± SEM. CMAP: potenciales de acción muscular compuesto; CNAP: potenciales de acción compuesto en nervio sensorial; MNCV: velocidad de conducción nerviosa motora; SNCV: velocidad de conducción nerviosa sensorial; -p: segmento proximal del nervio; -d: segmento distal del nervio.

(n=6 para AAVrh10-mock en S7 y S8, n=16 en S7 y n=14 en S8 para AAVrh10-NRG1typelll;

\*p<0,05)



**Figura 61.** Representación de las velocidades de conducción motora y sensorial del segmento proximal del nervio en los animales inyectados con AAVrh10-mock o NRG1typeIII.

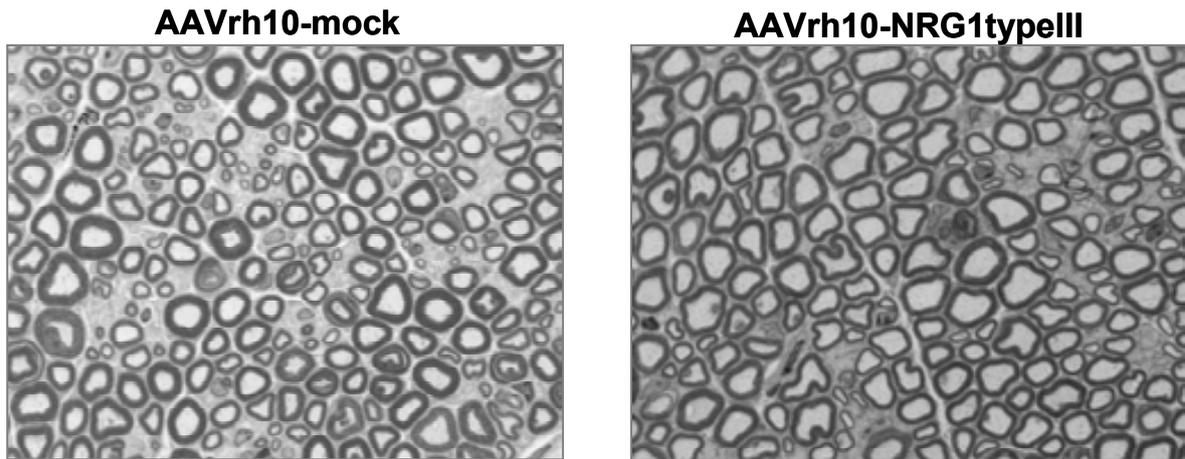
MNCV: velocidad de conducción nerviosa motora; SNCV: velocidad de conducción nerviosa sensorial; -p: segmento proximal del nervio.

(n=6 para AAVrh10-mock en S7 y S8, n=16 en S7 y n=14 en S8 para AAVrh10-NRG1typeIII;

\* $p < 0,05$ )

En la **Tabla 2** y en la **Figura 61** se pueden observar los datos electrofisiológicos obtenidos de los animales inyectados. Se muestra una mejora estadísticamente significativa entre el 17-20% a semana 7 y más acentuada entre 20-25% a semana 8 ( $p < 0,05$ ), en las velocidades de conducción motora y sensorial a nivel del segmento proximal del nervio, en los animales inyectados con NRG1typeIII respecto a los animales controles. No se observaron cambios en las medidas de las latencias y en las amplitudes. Estos resultados correlacionan con la sobreexpresión encontrada tanto en ganglios de la raíz dorsal (componente sensorial) como en la médula espinal (componente motor) y la activación observada de la vía de NRG1typeIII.

A continuación se realizó el análisis morfométrico de secciones de nervios tibiales de los animales inyectados, para estudiar el efecto de nuestro transgén.



**Figura 62.** Imágenes representativas de las secciones de los nervios tibiales de los animales inyectados con AAVrh10-mock y NRG1typelll

Por último, se realizó un conteo visual de las fibras degeneradas y de los macrófagos presentes en toda la sección de nervio y posteriormente se analizaron 300 fibras de cada nervio utilizando una tableta Wacom y el programa ImageJ para calcular todos los parámetros que se pueden observar en la **Tabla 3**.

	AAVrh10-mock (n=4)	AAVrh10-NRG1typelll (n=6)
<b>Número de MF</b>	1212 ± 108	1273 ± 78
<b>Diámetro de MF (µm)</b>	4.94 ± 0.28	5.72 ± 0.05*
<b>Diámetro axonal (µm)</b>	2.52 ± 0.19	2.97 ± 0.05*
<b>g ratio</b>	0.561 ± 0.020	0.549 ± 0.008
<b>Grosor de la mielina (µm)</b>	1.21 ± 0.07	1.37 ± 0.018
<b>Número de DF</b>	63 ± 5	46 ± 3*

**Tabla 3.** Los datos están expresados como las medias ± SEM.

MF (fibras mielinizadas), DF (fibras degeneradas)

\*p<0,05

En los resultado morfométricos (**Tabla 3**) se puede observar un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) del 15% en el diámetro axonal y del 13,6% en el de las fibras mielinizadas en los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII. Además se observó un aumento del 12% en el grosor de la mielina. En relación a la presencia de macrófagos, en los nervios de los animales inyectados con AAVrh10-mock se detectaron entre 1-2 por sección y entre 0-1 en los que se había inyectado AAVrh10-NRG1typeIII. Además, el contaje de número de fibras degeneradas está estadísticamente disminuido en un 27% ( $p < 0,05$ ) en los animales con sobreexpresión de NRG1typeIII respecto a los controles.

## ***DISCUSIÓN***



La *diabetes mellitus* (DM) es un trastorno multifactorial y multisistémico que tiene como característica principal el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), resultado de una defectuosa secreción de insulina, en su acción, o ambos. La insulina, hormona polipeptídica sintetizada por las células beta pancreáticas en los islotes de Langerhans, es la encargada de que la glucosa presente en sangre después de una ingesta pueda penetrar en las células de los principales tejidos para ser metabolizada, por tanto cualquier alteración en la hormona provoca que la glucosa se acumule en el torrente sanguíneo, principal característica de la enfermedad.

Dependiendo de la etiología, hay dos tipos principales de diabetes, la diabetes tipo I y tipo II. También encontramos cada vez con más prevalencia la DM gestacional donde parece ser que las hormonas del embarazo reducen la capacidad que tiene el cuerpo de utilizar y responder a la acción de la insulina; la diabetes insípida, resultado de un déficit de la hormona antidiurética (vasopresina) que es la encargada de limitar la producción excesiva de orina; o la diabetes tipo MODY, que es una diabetes hereditaria donde se presentan alteraciones en los genes MODY que codifican para factores de transcripción implicados en el desarrollo embrionario (Molven *et al.*, 2008; Boesgaard *et al.*, 2010; Meur *et al.*, 2010).

De los dos tipos principales de diabetes, menos del 10% de los afectados por la diabetes padecen el tipo I. A este tipo, también se le llama diabetes juvenil porque la afectación empieza en una época temprana de la vida. La sintomatología que presentan los pacientes viene dada por la destrucción de las células beta, debido a procesos autoinmunes o idiopáticos. A pesar de que normalmente las personas con este tipo de diabetes tienen predisposición genética a la enfermedad, está descrito que desencadenantes ambientales como el virus Coxsackie B también estarían implicados (Jaidane and Hober, 2008; Cambuli *et al.*, 2009; Erlich *et al.*, 2009b; Julier *et al.*, 2009).

La diabetes tipo 2 es la forma más común dentro de la DM y normalmente se presenta en etapas adultas. Se desarrolla por un complejo mecanismo fisiopatológico debido a una resistencia celular a las acciones de la

insulina, que llevará progresivamente a una deficiente secreción de insulina por el páncreas. La deficiente disponibilidad de la insulina conlleva una disfunción del metabolismo celular, resultando en un aumento en los ácidos grasos, en los niveles circulantes de triglicéridos y un descenso en la concentración de la lipoproteína de alta densidad (HDL) (Acheson, 2010; He *et al.*, 2010).

En los dos tipos principales de diabetes y a pesar del tratamiento con insulina, los pacientes acaban desarrollando complicaciones como la neuropatía diabética (ND), que con una prevalencia entre el 40-60% dentro de los pacientes diabéticos y con una incidencia anual del 3%, es la complicación de la diabetes que ocasiona la mayoría de las hospitalizaciones (Shaw *et al.*, 1999).

En la ND se encuentran afectados tanto los componentes sensorimotores como autónomos del SNP. La polineuropatía sensorimotora que se desarrolla en los pacientes diabéticos es la neuropatía periférica más común y afecta en mayor o menor grado a todos los tipos de fibras nerviosas. La percepción sensorial anormal de los pacientes diabéticos afecta principalmente los pies y las partes inferiores de las extremidades y va progresando hacia las extremidades superiores y se caracteriza por una fase inicial donde se puede presentar sensación de hormigueo, dolor y quemazón, entre otras, para finalmente acabar con la pérdida de la sensación de dolor y temperatura. En las etapas finales de la ND puede aparecer deformidad neuropática e incluso úlceras en los pies que pueden llegar a desembocar en amputaciones. De hecho, se calcula que se corresponden con un 40% de las amputaciones no traumáticas de las extremidades (Shaw *et al.*, 1999).

Los estudios en los pacientes diabéticos que presentan ND no están bien estandarizados. En general los síntomas electrofisiológicos se caracterizan por una disminución de la velocidad de conducción nerviosa y por unos potenciales de acción compuestos del músculo anormales, pero las fibras nerviosas afectadas son diferentes dependiendo de los pacientes por lo que es difícil unificar los estudios epidemiológicos, que además varían según la

población estudiada y la duración de la diabetes. Normalmente, para el diagnóstico se utilizan tests de respuesta a temperatura y análisis de los reflejos a nivel de las extremidades inferiores (Park *et al.*, 2007; Lauria *et al.*, 2009).

El diagnóstico de los pacientes con neuropatía diabética generalmente se realiza una vez ya ha aparecido la sintomatología y el tratamiento con insulina o incluso el trasplante de páncreas no han conseguido revertir la progresión de la complicación (Navarro *et al.*, 1996). Este hecho indicaría que es muy necesario poder realizar un tratamiento específico para esta patología del SNP en las etapas iniciales del desarrollo de la diabetes. Para ello se necesita profundizar en el mecanismo patogénico que lleva a desencadenar la complicación y especialmente en qué tipo celular está primariamente afectado al inicio del desarrollo de la complicación.

En los primeros estudios que se realizaron en este trabajo, se analizaron las alteraciones de las células de Schwann (SC) frente al aumento de la concentración de glucosa y disminución de la insulina. Para ello se utilizaron cultivos de SC, tanto establecidos como primarios, sometidos a cambios en las concentraciones de glucosa e insulina, emulando los que se dan en los pacientes con diabetes.

Los resultados mostraban alteraciones en la principal proteína de la mielina periférica, P0. En nuestros experimentos, P0 se veía afectada por la concentración de glucosa, a nivel de expresión de mRNA observándose una disminución significativa entre el 60 y el 80%, resultados obtenidos por PCR cuantitativa. A nivel de proteína, el aumento de la concentración de glucosa estaba disminuyendo la actividad del promotor P0, también entre el 60 y el 80%, resultados observados por FACS utilizando un constructo con la proteína GFP bajo la regulación del promotor P0. Ambos experimentos mostraban que era la concentración de glucosa pero no la disminución de insulina la que estaba causando este efecto. De hecho, estudios publicados por el grupo de Fernyhough, han reportado que la presencia o no de insulina, en neuronas

sensoriales de animales diabéticos, no afectaba a la neurodegeneración (Zherebitskaya *et al.*, 2009).

La utilización de los cocultivos de SC y neuronas sensoriales cultivados con diferentes concentraciones de glucosa nos permitieron corroborar los resultados *in vitro* ya que se obtuvieron datos concordantes. En este caso, además de P0, también se pudo estudiar la expresión de las proteínas MBP, PMP22 y MAG mediante PCR cuantitativa, y ver cómo la elevada concentración de glucosa estaba disminuyendo también la expresión de MBP y PMP22 entre un 50 y un 70%.

Una vez se observaron los efectos de la concentración de glucosa *in vitro* se analizó lo que ocurría *in vivo*, en animales diabéticos.

De momento, no existe un modelo murino ideal para ND ni para las otras complicaciones de la DM, ya que aunque muchos presentan características que recuerdan las afectaciones humanas, éstas no son tan severas, principalmente porque los ratones no sobreviven el tiempo suficiente para presentar las manifestaciones más habituales de las complicaciones a largo plazo.

En muchos estudios se utiliza un modelo de diabetes experimental inducida mediante la administración de estreptozotocina (STZ). La estreptozotocina (STZ, 2-deoxy-2-([methyl(nitroso)amino]carbonilo-amino)- $\beta$ -D-glucopyranose) pertenece al grupo de drogas antineoplásicasalquilantes conocidas como alquilnitrosoureas. Es una molécula similar a la glucosa y se transporta específicamente dentro de las células beta pancreáticas mediante los transportadores GLUT2, que se expresan a un nivel elevado en estas células, y no es reconocida por otros transportadores de glucosa (Schnedl *et al.*, 1994; Wang and Gleichmann, 1998). Como todas las drogas del tipo nitrosourea, la toxicidad es causada por daño en el DNA celular, en este caso la STZ incrementa la generación de radicales libres  $O_2^-$  por el sistema xantina oxidasa de las células beta pancreáticas y estimula la generación de  $H_2O_2$  causando la fragmentación del DNA en los islotes pancreáticos. Además el

metabolismo de la STZ genera óxido nítrico y éste al reaccionar con los radicales superóxido genera peroxinitrito, ambas moléculas también implicadas en la degeneración de las células pancreáticas.

Así, en el modelo murino en el que se administra STZ a bajas dosis consecutivas, se recrea en cierto modo la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas igual que ocurre en la diabetes, ya que va destruyendo estas células productoras de insulina, a la vez que produce una infiltración en los islotes de Langerhans. Además, el uso de este fármaco nos permite la sincronización del desarrollo de la diabetes, minimizando así la variabilidad entre animales, lo que no ocurre con los animales que desarrollan DM espontáneamente. Estos animales presentan como sintomatología neuropática hiperalgesia termal (Cameron *et al.*, 2001b; Calcutt, 2004; Li *et al.*, 2005a), además de una reducida densidad en la inervación intraepidérmica e hipoalgesia en una diabetes a más largo plazo. También presentan disminución tanto de la velocidad de conducción nerviosa como sensorial (Calcutt, 2004; Obrosova *et al.*, 2005b; Obrosova *et al.*, 2008; Homs *et al.*, 2010b) (Ver **Anexo 2**).

Existen algunas cepas murinas que espontáneamente o con dieta alta en lípidos generan diabetes y también se están utilizando como modelos de ND. Así por ejemplo se ha descrito que un 80% de las hembras NOD (non-obese diabetic) empiezan a desarrollar diabetes espontánea sobre la semana 12 de vida, y también se ha observado que a 3-5 semanas después del inicio de la enfermedad empiezan a presentar distrofia neurítica en el sistema nervioso entérico, dando lugar a neuropatía gastrointestinal (Schmidt *et al.*, 2003). Estos animales presentan una mutación en el receptor TRPV1 (*transient receptor potential cation channel*) presente en las neuronas sensoriales que también controla el estrés oxidativo de las células beta pancreáticas y la inflamación de los islotes en la diabetes autoinmune (Razavi *et al.*, 2006), siendo un modelo utilizado para diabetes tipo I.

Como modelo de diabetes tipo I también se están utilizando los ratones Akita (B6Ins2). Estos animales tienen una mutación dominante en el gen de la

insulina<sup>2</sup> que provoca una disrupción en un puente disulfuro, necesario para el correcto procesamiento de la insulina dando lugar a una proteína no funcional y a la apoptosis de las células beta pancreáticas, lo que lleva al desarrollo espontáneo de la diabetes (Yoshioka *et al.*, 1997; Mathews *et al.*, 2002; Ron, 2002; Izumi *et al.*, 2003). Estos ratones presentan distrofia neurítica y neuropatía en ganglios simpáticos (Schmidt *et al.*, 2009), además de hipoalgesia y disminución en la velocidad de conducción sensorial (SNCV) (Choeiri *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2007).

Los ratones insulopénicos BB/Wor (bio-breeding Worcester) desarrollan espontáneamente diabetes tipo I después de una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas igual que en humanos (MacKay *et al.*, 1986). También se han utilizado como modelos de diabetes tipo I ya que presentan hiperalgesia además de disminución en la velocidad de conducción nerviosa motora y sensorial (Sima *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2004; Kamiya *et al.*, 2005).

Por otra parte, en el ratón transgénico que sobreexpresa aldosa reductasa específicamente en las células de Schwann se observa en condiciones de hiperglucemia un mayor déficit en la velocidad de conducción nerviosa tanto motora como sensorial y un aumento del estrés oxidativo, respecto a ratones controles, sugiriendo una contribución importante de aldosa reductasa al estrés oxidativo presente en sistema nervioso periférico en la diabetes (Song *et al.*, 2003).

Para diabetes tipo II, los modelos más utilizados son los ratones deficientes en leptina (ob/ob), además de los que expresan mutaciones en el receptor de leptina (db/db). La disrupción de la señalización hipotalámica de la leptina desemboca en una hiperfagia, obesidad y resistencia a la insulina. Estos animales presentan una reducida densidad en la inervación intraepidérmica (Drel *et al.*, 2006; Vareniuk *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2007), además de reducida sensibilidad termal, velocidad de conducción nerviosa en la cola (TSNCV) y latencias motoras distales de la cola (TDML) (Sullivan *et al.*, 2007).

Otro modelo de diabetes tipo II que se ha estudiado son las ratas ZDF (Zucker Diabetic Fatty), que también presentan una alteración en el receptor de la leptina. Estos animales muestran una reducida densidad en la inervación intraepidérmica (Brussee *et al.*, 2008), una disminución en la velocidad de conducción nerviosa tanto sensorial como motora, además de unos niveles de CGRP (*calcitonina gene-related peptide*) disminuidos (Li *et al.*, 2006).

También se ha descrito hipoalgesia y una reducida densidad en la inervación intraepidérmica en ratones machos Swiss Webster, animales diabéticos que son obesos sin tener ninguna deficiencia en el metabolismo de la leptina y que serían otro modelo a tener en cuenta en el caso de diabetes tipo II (Beiswenger *et al.*, 2008; Lemke *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2008).

En este trabajo nos centramos en modelos de diabetes tipo I. El primer modelo utilizado en este trabajo fue el de inducción de diabetes experimental mediante la administración de dosis bajas y consecutivas de STZ.

El análisis de los nervios ciáticos de estos animales a diferentes tiempos desde la inducción de la diabetes mostraban una disminución en la expresión de las proteínas de la mielina ya a semana 1 de hiperglucemia y que se iba acentuando a medida que los animales tenían más tiempo de enfermedad hasta llegar a una reducción del 70-85% de la expresión a semana 16. Estos resultados parecen indicarnos que con la progresión de la enfermedad la afectación de las fibras aumentaría en esta cepa, al menos a nivel molecular.

Para corroborar estos resultados, se utilizaron dos modelos animales más de diabetes tipo I. Los ratones NOD (non-obese diabetic) que se utilizan ampliamente como modelo de diabetes tipo I y, a diferencia de los ICR, desarrolla la enfermedad espontáneamente. Los resultados de PCR cuantitativa en los nervios ciáticos de estos animales, una vez habían desarrollado la diabetes, mostraban igual que en el otro modelo estudiado, una disminución significativa entre el 50-60% en la expresión de las proteínas de la mielina P0, MBP y PMP22.

Además de realizar estudios mediante real-time PCR también se realizaron western blots para P0 y MBP para analizar la afectación a nivel de proteína. Los resultados en ICR adultos y NOD (no mostrados) no nos indicaban una clara disminución a este nivel, debido seguramente a que estas proteínas una vez la mielina está bien formada, presentan una tasa de recambio muy lenta que puede llegar a ser de 210 días (Singh and Jungalwala, 1979).

Por esta razón se decidió utilizar un tercer modelo animal en que se inducía la diabetes experimental tan sólo nacer, justo en el momento en el que empieza la mielinización y por lo tanto aún no se han compactado las proteínas de la mielina. Los animales se sacrificaban a día 18 postnatal cuando está presente el pico de expresión de las proteínas de la mielina (Bermingham *et al.*, 1996).

Los resultados en este modelo también nos mostraban una disminución significativa sobre el 60% del mRNA de las principales proteínas de la mielina y por primera vez pudimos observar que también estaba afectada la expresión de la principal proteína de la mielina, P0, mediante western blot, también con una reducción del 60%. Este hecho reafirmaba nuestra hipótesis de que en los animales adultos no podíamos observar cambios significativos a nivel de proteína por la elevada estabilidad de éstas.

En el proceso de mielinización, que lleva a que las SC se diferencien en mielinizantes y sinteticen las proteínas de la mielina, intervienen diferentes factores de transcripción promielinizantes, entre ellos los más importantes Oct6, Brn2, Sox10 y Egr2. Su expresión está involucrada directamente con la de las principales proteínas de la mielina (Nagarajan *et al.*, 2001). La máxima expresión de Oct6 y Brn2 se da durante el desarrollo embrionario mientras que la de Egr2 está presente en ratones adultos igual que Sox10. Por ello, se analizó la expresión de estos dos últimos factores de transcripción mediante PCR cuantitativa, en los mismos modelos *in vitro* e *in vivo* para ver qué grado de afectación presentaban y si eran los causantes de la disminución en la expresión de las proteínas de la mielina.

El análisis *in vitro* e *in vivo* de los factores de transcripción Sox10 y Egr2 mostraba una disminución de la expresión, estadísticamente significativa, entre el 50 y el 70% con la hiperglucemia, indicándonos que la reducción de los niveles de las proteínas de la mielina estaba directamente relacionada con la disminución de estos factores promielinizantes. Junto a estos factores se analizó también la expresión de las proteínas nab1 y nab2, al estar descritas como moléculas correguladoras de Egr2 (Svaren *et al.*, 1998), y se observó una expresión también alterada, que se correspondía linealmente a la observada para Egr2 (Ver **Figura 26**).

No se observó una disminución significativa en los ratones de la cepa NOD para Egr2 mediante WB (resultados no mostrados), debido seguramente a que estos animales desarrollan la DM de forma no sincronizada por lo que el tiempo de la enfermedad es variable dentro del grupo. En los ICR adultos no se observó una disminución significativa a nivel de proteína hasta la semana 8 de diabetes cuando presentaban una disminución del 60% en la expresión del mRNA. La disminución de Egr2 que se obtuvo mediante PCR cuantitativa en los animales NOD en el tiempo analizado era del 35%. Posiblemente un análisis a más largo plazo de diabetes en estos animales también nos mostraría reducción de la proteína Egr2, sin embargo es difícil realizar estos estudios ya que los animales NOD no sobreviven fácilmente a la hiperglucemia ya que mueren a los pocas semanas.

Nuestros resultados relativos a la alteración de las SC en cultivos con diferentes concentraciones de glucosa, concuerdan con diferentes trabajos donde se ha descrito el efecto inhibitorio del aumento en la glucosa tanto en la proliferación como en la migración, y aunque no estimula la apoptosis en las SC, induce la parada de su ciclo celular en G1 (Eckersley, 2002; Gumy *et al.*, 2008).

También se ha demostrado el efecto que ejerce la hiperglucemia en el estrés oxidativo mitocondrial, donde la elevada concentración de glucosa induce alteraciones en las proteínas asociadas a disfunción mitocondrial, en las proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa y el ciclo de los ácidos

tricarboxílicos, además de alteraciones en los enzimas detoxificantes como el aumento en la expresión de la superóxido dismutasa mitocondrial, inducido para contrarrestar el incremento de los niveles de superóxido (Zherebitskaya *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010)

Parece ser que la causa directa del estrés oxidativo presente en las SC proviene de la activación del enzima aldosa reductasa a elevadas concentraciones de glucosa, el cual genera esta disfunción celular al inducir un aumento en la fructosa y el sorbitol intracelular, unido a la glicosilación proteica que provoca que disminuya la concentración de NADPH, cofactor que es necesario para la regeneración del glutatión reducido (Brownlee, 2001; Obrosova, 2009). Los niveles de sorbitol elevados pueden llegar a producir un desequilibrio en diferentes osmolitos como moduladores de calcio u otras moléculas implicadas en señalización (Thomas *et al.*, 1993; Nakashima *et al.*, 2005; Askwith *et al.*, 2009). Además, en todas estas publicaciones las bajas concentraciones de insulina no son las responsables de modular el estrés de las SC sino el acúmulo de glucosa, hecho que también respalda nuestros resultados *in vitro* donde no observamos ningún efecto deleterio en la expresión de P0 con hipoinsulinemia, pero sí con hiperglucemia.

También se han descrito muchos trabajos donde mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de la mielina llevan al desarrollo de diferentes neuropatías hereditarias como distintos tipos de Charcot-Marie-Tooth (CMT), neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión (HNPP), hipomielinización congénita (CH), Síndrome Déjérine-Sotas (DSS), enfermedad de Roussy-Levy (RLD) (Scherer and Wrabetz, 2008; Stangler Herodez *et al.*, 2009; Zschuntzsch *et al.*, 2009; Souayah and Tick Chong, 2010).

De las proteínas de la mielina estudiadas sólo hemos observado cambios en las más abundantes, P0, MBP y PMP22, aunque hay que acabar de confirmar la afectación de estas proteínas de la mielina mediante western blot, pues sólo hemos podido obtener datos para P0. No sabemos del cierto porqué, pero no se ha observado ningún cambio en la expresión de MAG, aunque existen algunas hipótesis que podrían explicar estos resultados.

Una hipótesis podría tener relación con la localización de las proteínas estudiadas. MAG se encuentra en el dominio no compacto de la mielina junto a MP11, conexina 32 y otras proteínas implicadas en las uniones intercelulares. P0, MBP y PMP22, por el contrario, se encuentran en el dominio de mielina compacta. Para MP11 no se ha encontrado ninguna alteración ni en modelos murinos ni en pacientes, pero su descripción es bastante reciente (Ryu et al., 2008). En cambio, se ha analizado el efecto de la hiperglucemia en las gap-junctions, sobretodo en SNC, y aunque está alterada la expresión de algunas conexinas, la afectación principal se encuentra en la Cx43. No se ha descrito ningún cambio en la Cx32 (Fernandes *et al.*, 2004; Makino *et al.*, 2008; Gandhi *et al.*, 2010; Orellana *et al.*, 2010), aunque sí se han descrito mutaciones en Cx32, que llevan al desarrollo de neuropatías hereditarias en humanos y una neuropatía periférica en edades avanzadas en ratones (Willecke *et al.*, 1999; Abrams *et al.*, 2000).

Además, no existen ratones mutantes espontáneos para la proteína MAG y los ratones *knock-out* generados para esta proteína muestran una mielinización en SNC y SNP normal aunque presentan zonas con alteraciones en la compactación. Sólo a edades avanzadas empiezan a mostrar síntomas de degeneración axonal (Pan *et al.*, 2005).

Estos datos nos hacen pensar que es posible que la hiperglucemia altere primariamente la mielina compacta, pero para acabar de confirmarlo se tendrían que analizar las otras proteínas que forman parte del dominio no compacto, en los modelos *in vitro* e *in vivo*. También sería interesante analizar qué pasa en nuestros modelos animales aún a más largo plazo, y si se observara algún cambio a nivel de expresión en MAG y Cx32, podríamos llegar a la conclusión de que la hiperglucemia afecta a toda la fibra nerviosa aunque inicialmente al dominio de mielina compacta.

La disminución que habíamos observado nosotros en la expresión para la principal proteína de la mielina (P0) *in vivo*, se describió en nervios ciáticos de ratas diabéticas, 20 semanas después de la inducción de la diabetes con STZ, durante la realización de este trabajo. Igual que en nuestros resultados,

los autores sólo habían encontrado cambios a nivel de expresión de mRNA (Kawashima *et al.*, 2007), pero nuestras observaciones muestran una afectación mucho más temprana de las células de Schwann ya a los primeros días de DM, que ellos no habían estudiado. Tampoco se han reportado estudios referentes a las otras proteínas de la mielina.

Además, por primera vez se está correlacionando esta afectación con niveles alterados de dos de los principales factores promielinizantes, Sox10, Egr2 y sus correguladoras nab1 y nab2. Hasta la actualidad se había descrito la función de estos factores y su importancia en la mielinización en modelos animales deficientes para estas proteínas y en pacientes donde se observaba que mutaciones en estos genes daban diferentes fenotipos de neuropatía hereditaria (Timmerman *et al.*, 1999; Britsch *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2006) pero nunca se había observado alteración en su expresión en modelos murinos o en pacientes con neuropatía diabética.

Todos estos factores interaccionan y se regulan entre ellos durante el proceso de mielinización. Oct6/Brn2, que se expresan principalmente durante el desarrollo, tienen como principal diana a Egr2 a través de un enhancer presente en el locus de Egr2 llamado MSE (*Myelinating Schwann cell Element*) (Ghislain *et al.*, 2002). A su vez, y para que esto ocurra, es necesaria la actuación de Sox10. Experimentos de cotransfección muestran que sinérgicamente Oct6, Brn2 y Sox10 activan la expresión de los genes a través de este enhancer (Ghislain and Charnay, 2006). Aunque Oct6 y Brn2 se sobreexpresan durante la diferenciación de las SC, Sox10 está presente durante todos los estadios del desarrollo de estas células, de modo que la regulación de la mielinización es una cascada donde Sox10 regula la expresión de Oct6/Brn2, de hecho estas proteínas tienen elementos de unión para Sox10 (Schreiner *et al.*, 2007), y éstos subsecuentemente estimulan la expresión de Egr2 (Shen-Orr *et al.*, 2002; Swiers *et al.*, 2006). Sería muy interesante analizar, en los modelos *in vitro*, el efecto de la concentración de glucosa sobre este enhancer para continuar con la caracterización de esta vía de señalización y su alteración por la concentración de glucosa.

Los primeros estudios que se realizaron en pacientes diabéticos con ND bien establecida mostraban una combinación en la desmielinización y degeneración axonal, pero posteriormente el análisis en pacientes diabéticos que aún no presentaban evidencias de esta complicación mostraban desmielinización pero sin pérdida o atrofia axonal. Estos datos sugieren que el tipo celular implicado primariamente en el desarrollo de la ND sería las SC. Ya se ha postulado para otras enfermedades neurodegenerativas que el defecto primario podría estar localizado en las células responsables de la producción de la mielina, SC en SNP o oligodendrocito en SNC (Popko, 2003). Todos estos hechos, unidos a que el 100% de los pacientes con diabetes presentan alteraciones a nivel electrofisiológico aún sin presentar una ND bien establecida, apoyan nuestros resultados donde hemos observado afectación de las SC en tan tempranos estadíos del desarrollo de la diabetes (Aguilar-Rebolledo, 2005).

Además del estrés oxidativo causado por la hiperglucemia, las alteraciones en la expresión de factores neurotróficos también podrían estar implicadas en la patogenia del desarrollo de la ND. Estos factores de crecimiento son necesarios en las neuronas y las células gliales ya que son críticos mediadores que dirigen y regulan la supervivencia, el crecimiento, la plasticidad morfológica y la síntesis de proteínas que permiten las diferentes funciones neuronales, además de mediar las correctas interacciones axón-glía necesaria por ejemplo en los procesos de regeneración neuronal. Se han descrito alteraciones en la expresión de diferentes factores tróficos en modelos animales de ND, de hecho, se han encontrado las disminuciones más importantes en NGF, IGF-I, CNTF, GDNF, NT-3 y BDNF (Ha *et al.*, 2001; Leininger *et al.*, 2004; Giannini *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

Está descrito que las SC, que como ya hemos comentado anteriormente sufren muchos cambios degenerativos durante la ND, responden a muchos de estos factores tróficos, rescatándolas de la apoptosis inducida por la hiperglucemia y regulando su movilidad, función crítica para la correcta formación de las interacciones axón-glía (Delaney *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2000). Entre estos factores tróficos se encuentran las neuregulinas, una familia

de factores gliotróficos que transducen sus señales mediante los receptores ErbB tirosina quinasa y que son necesarias para el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de las SC (Adlkofer and Lai, 2000). Dentro de la familia de las neuregulinas, la más conocida y descrita es la NRG1 y sus tres subtipos NRG1<sub>typeI</sub>, <sub>typeII</sub> y <sub>typeIII</sub>. Todas las neuregulinas presentan un dominio EGF-like que es el encargado de interaccionar con los receptores ErbB y desencadenar la señalización (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1998).

Se conoce que ErbB2 está altamente expresado en las SC durante la mielinización y sufre una reducción en la expresión durante la etapa adulta. Por el contrario ErbB3 se mantiene sin cambios durante el desarrollo de las SC (Grinspan *et al.*, 1996). Además, la expresión de los receptores ErbB puede verse afectada en respuesta a una lesión nerviosa (Carroll *et al.*, 1997).

También está descrita la importancia de la isoforma NRG1<sub>typeIII</sub>, ya que es la cantidad de esta proteína presente en la superficie axonal la que induce la diferenciación de las SC a células mielinizantes, indicando la cantidad de mielina que recubrirá el axón. Por otra parte, la expresión de NRG1<sub>typeI</sub> se localiza exclusivamente en etapas embrionarias.

Además, NRG1<sub>typeIII</sub> también está involucrada en la activación de la expresión de los principales factores de transcripción promielinizantes Oct6, Egr2 y Sox10, y a su vez la expresión de la principal proteína de la mielina periférica P0, siendo únicamente esta isoforma y no la <sub>typeI</sub> y <sub>typeII</sub>, la que induce la expresión de estas proteínas (Taveggia *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Kao *et al.*, 2009).

Estos datos nos llevaron a estudiar la expresión de NRG1<sub>typeIII</sub> en nuestros modelos *in vitro* e *in vivo*, para analizar si a etapas iniciales de la diabetes también coexistía una afectación a nivel neuronal, y si NRG1<sub>typeIII</sub> estaba implicada con los resultados que habíamos obtenidos en las SC.

Para el análisis *in vitro* se utilizaron los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias, cultivos de neuronas sensoriales purificadas y cultivos de

neuronas motoras, incubados con diferentes concentraciones de glucosa. Para la detección de esta isoforma en concreto mediante PCR cuantitativa se utilizaron primers específicos del dominio rico en cisteínas únicamente presente en la NRG1typeIII. Los resultados nos mostraban una disminución estadísticamente significativa entre el 40-60%, tanto en los dos tipos de cultivo de neuronas sensoriales como en las motoras.

Estos resultados se confirmaron *in vivo*, en los tres modelos murinos que habíamos utilizado para el análisis de las proteínas de la mielina y de los factores promielinizantes. El análisis de la expresión en las neuronas sensoriales se realizó mediante procesamiento de los ganglios de la raíz dorsal de la zona lumbar distal (L4 a 6), que son los que inervan el nervio ciático, y para el estudio en las motoneuronas se utilizaron las muestras de médula espinal también de esta zona.

En la cepa ICR ya se observaba una disminución estadísticamente significativa del 65% tres días después de la inducción de la diabetes experimental y se mantenían estos niveles reducidos al menos hasta el último tiempo ensayado que fue a 16 semanas postinducción, tanto en neuronas sensoriales como motoras. En los otros modelos estudiados también se obtuvieron los mismos resultados, tanto en NOD como ICR jóvenes, donde se observó una disminución entre el 50-60% en la expresión de NRG1typeIII en los dos tipos neuronales

En condiciones de hiperglucemia durante la diabetes, la célula metaboliza más glucosa generando más radicales libres y acumulando ROS (*reactive oxygen species*), hecho que está descrito que acaba alterando el potencial de membrana mitocondrial y comprometiendo las funciones celulares, sobretodo en las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (Figueroa-Romero *et al.*, 2008; Wiggin *et al.*, 2009).

Aunque en los modelos animales de diabetes tipo I parece claro que es sólo la hiperglucemia la implicada en la afectación neuronal (Leininger *et al.*, 2006; Zaruba *et al.*, 2007; Ozturk *et al.*, 2008), en los modelos de diabetes tipo

Los más utilizados, que son los que presentan mutaciones en la leptina o en su receptor, como los ratones ob/ob o db/db, se cree que sería la acumulación de lípidos lo que llevaría a esta degeneración neuronal, más que la hiperglucemia. Los estudios muestran una activación del estrés oxidativo y disfunción neuronal tras la dislipidemia y antes de que estos ratones presenten una tolerancia a la glucosa alterada (Vincent *et al.*, 2009a; Vincent *et al.*, 2009b; Vincent *et al.*, 2009c). Nuestros estudios se han realizado sólo en modelos animales de diabetes tipo I, sin embargo, sería interesante analizar qué ocurre en modelos de diabetes tipo II para estudiar si el estrés oxidativo causado por la dislipidemia e implicado en la ND en estos animales también está afectando la expresión de NRG1typeIII o por el contrario es sólo un efecto de la hiperglucemia y afecta únicamente a los animales con diabetes tipo I.

Los resultados obtenidos para la expresión de NRG1typeIII concuerdan perfectamente con los que habíamos obtenido para las proteínas de la mielina y los factores promielinizantes. La expresión de NRG1typeIII es la que se encuentra más afectada en los estadios más iniciales de la diabetes indicándonos que estaría al inicio de la cascada de señalización y su alteración sería la causa directa de la alteración del metabolismo de la mielina a nivel de SC. Por todo ello, las neuronas parecían ser el tipo celular primariamente afectado durante el desarrollo de la ND. Para confirmar esta hipótesis, sería interesante analizar el ratón NRG1typeIII<sup>+/-</sup> y ver si presenta mayor afectación neuropática después de la inducción de la diabetes experimental.

Sin embargo, es necesario para acabar de corroborar esta hipótesis y confirmar los resultados, analizar con más detalle la expresión de NRG1typeIII. Debido a que actualmente los anticuerpos comerciales disponibles no reconocen específicamente esta isoforma de la proteína, se pretenden realizar estudios de hibridación *in situ* en los ganglios de la raíz dorsal y en médulas espinales de los animales diabéticos con sondas específicas para NRG1typeIII. Además analizaremos si las otras principales isoformas NRG1typeI y typeII están afectadas durante la hiperglucemia. También sería interesante tener la posibilidad de analizar muestras de pacientes con diabetes tipo I con o sin ND, y estudiar si también presentan disminución de NRG1typeIII.

Nuestros resultados muestran un efecto de la hiperglucemia en una etapa muy inicial del desarrollo de la ND, sólo tres días después de la inducción de la diabetes la expresión de NRG1 $\alpha$  ya está reducida un 60%. En todos los trabajos publicados, normalmente se ha analizado la afectación en etapas mucho más avanzadas de la complicación, por lo que no se sabe si las otras causas implicadas en el desarrollo de la ND, como el estrés oxidativo, también están ya alteradas en el inicio de la diabetes. En nuestro grupo se analizó la actividad de aldosa reductasa y se observó un aumento ya a semana 1 después de la inducción y también observamos que PARP estaba activado al mismo tiempo analizado (Homs *et al.*, 2010b) (Ver **Anexo 2**). Estos resultados nos indican que sería necesario realizar un análisis mucho más temprano de los factores implicados en el desarrollo de la ND, porque al menos algunos están ya alterados.

Después de los resultados obtenidos y como prueba de concepto, analizamos si la sobreexpresión de NRG1 $\alpha$  en neuronas sensoriales y motoras revertía el fenotipo que habíamos observado tras la inducción de la hiperglucemia. Por esta razón, se realizaron las construcciones y producciones de vectores virales con los genes codificantes para las tres isoformas de las NRG1, con toda la secuencia codificante o únicamente con el dominio extracelular que se corresponde con la forma activa de la proteína una vez es procesada por las proteasas. Todas las secuencias presentaban un His-tag en el extremo 3' que nos facilitaba la inmunodetección de nuestros transgenes.

La transferencia génica en SNP presenta un elevado interés porque contiene diferentes tipos celulares que se pueden transducir, muchos de los cuales son postmitóticos. Para la transducción del SN, los vectores AAV2 son los que se han utilizado más extensamente ya que era el serotipo mejor caracterizado. Este serotipo presenta una elevada eficiencia de transducción en neuronas de las diferentes estructuras cerebrales, aunque la caracterización de nuevos serotipos recombinantes está mejorando la eficiencia de transducción a diferentes regiones cerebrales y médula espinal. Además el hecho de utilizar pseudotipos en vez de serotipos nos ofrece una ventaja a la

hora de compararlos ya que el genoma utilizado es exactamente el mismo y sólo cambian las proteínas de la cápside.

A menudo, según el pseudotipo de vector adenoasociado y el sistema de administración, la eficiencia de transducción de los diferentes tipos celulares varía, debido a que el tropismo de los diferentes vectores para un tipo celular concreto se debe a la estructura de la cápside y a la interacción con receptores celulares específicos (Storek *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2010).

Antes de proceder a la administración *in vivo* de nuestros vectores, queríamos testar su funcionalidad en cultivos celulares, por lo que producimos los correspondientes vectores lentivirales pues en la bibliografía estaba descrita la eficiencia de los lentivirus en la transducción de cultivos primarios y no disponíamos de suficiente información respecto a la transducción por parte de los vectores adenoasociados en este tipo de cultivos (Zala *et al.*, 2005; Harper and Gonzalez-Alegre, 2008; Li and Rossi, 2008; Li *et al.*, 2010; Wu and Lu, 2010).

En los primeros experimentos, se infectaron cultivos de HEK293 y se analizó la expresión mediante PCR cuantitativa, inmunocitoquímica y western blot. Los resultados nos mostraban una elevada expresión de NRG1 con las construcciones con el dominio extracelular. Las construcciones con la secuencia completa expresaban mucha menos proteína y mRNA, indicando una estabilidad menor del transcrito.

La funcionalidad de las construcciones se confirmó, cocultivando HEK293 infectadas con los vectores virales y SC primarias y analizando mediante western blot si los transgenes eran capaces de activar la fosforilación del receptor ErbB. Aunque no se realizaron inmunoprecipitaciones con los anticuerpos para ErbB2 o ErbB3, los western blot nos mostraban una proteína de 185kDa con fosforilación en residuos de tirosina, tamaño que se corresponde con el receptor ErbB2.

Además, la funcionalidad quedó confirmada cuando en los cocultivos de HEK293 con SC primarias se analizó la expresión de la proteína P0 y del factor promielinizante Egr2 mediante PCR cuantitativa. Ambas proteínas estaban aumentadas únicamente en los cocultivos transducidos con los dos constructos correspondientes a la isoforma NRG1typeIII, tal y como estaba descrito (Chen *et al.*, 2006). Los resultados nos indicaban además, que independientemente de la inestabilidad del mRNA con las construcciones FL, la cantidad de proteína era suficiente para fosforilar y activar la vía de señalización.

Con los vectores codificando para un marcador (GFP) estudiamos la eficiencia de transducción en los cultivos de neuronas sensoriales primarias con los vectores adenoasociados y lentivirales. Tal y como esperábamos, los cultivos se infectaban eficientemente con los vectores lentivirales y al analizar la transducción con diferentes serotipos de vectores adenoasociados, pudimos observar que AAVrh10 conseguía la mayor transducción de neuronas, seguido de AAV8, AAV2 y AAV1, cuando se realizaba la infección con el mismo número de partículas físicas por célula (PP/cel) para cada pseudotipo. La comparación entre dos vectores distintos se tiene que realizar por *transducing units* (TU), no por PP pues se trata de plataformas difíciles de comparar en término de genomas virales ya que las eficiencias de producción son muy diferentes. Así, utilizando el mismo número de TU para AAVrh10 y para el vector lentiviral, ambos conseguían una elevada transducción, entre el 85-100%, de los cultivos purificados pero ésta era un 5-10% superior y con una expresión más elevada con el vector adenoasociado. Estos resultados son debidos probablemente a la actividad del promotor, ya que el vector AAV contiene un promotor CAG y el lentiviral eF1 $\alpha$ , o por la transducción por parte del vector AAV con un número más elevado de copias. Además, en los cocultivos, AAVrh10 infectaba específicamente neuronas y los lentivirus no eran específicos, ya que también infectaban SC. El tropismo neuronal de AAVrh10 se confirmó en cultivos organotípicos, donde también se demostró su capacidad de difusión dentro del tejido ya que la parte interior del ganglio también presentaba una elevada transducción.

La administración de vectores de transferencia génica a SNP requiere una tecnología especializada. Se han descrito distintas vías de administración de genes terapéuticos en SNP, como la inyección subcutánea a nivel plantar, la administración directa en nervio ciático o en ganglios de la raíz dorsal y la inyección intratecal. Cada técnica presenta sus ventajas y desventajas sobretodo en la eficiencia de transducción y en la bioseguridad de la vía de administración.

Para tratar neuropatías como la diabética, necesitamos una transducción lo más generalizada posible ya que están afectados todos los nervios periféricos. Con la administración directa en ganglios de la raíz de dorsal se consigue únicamente transducción de las células localizadas en el sitio de inyección por eso se descartó a la hora de realizar nuestros experimentos, además de ser una técnica muy invasiva.

Con la inyección subcutánea a nivel plantar, donde se encuentran las terminaciones nerviosas del nervio ciático o mediante inyección directa a nervio ciático, obtendremos sólo transducción de las neuronas que proyectan hacia la extremidad, localizadas en la región lumbar. Resultados de nuestro grupo tras la inyección directa en nervio ciático con AAV1, AAV2, AAV8 y AAVrh10, mostraban un tropismo preferencial de AAV2 y AAVrh10 por neuronas, AAV8 transducía específicamente SC y con AAV1 se infectaban tanto neuronas como SC (Homs, 2010; Homs *et al.*, 2010a) (Ver **Anexo 1**).

Con la administración subcutánea no se consigue transducir neuronas motoras pues en los cojinetes plantares no hay terminaciones motoras. También necesitamos que el virus tenga una capacidad de retrotransporte notable. Hasta la actualidad, de entre los vectores virales que presentan más capacidad de transporte retroaxonal se encuentran los HSV (Goss *et al.*, 2002). Sin embargo, resultados de nuestro grupo muestran que AAVrh10 inyectado a nivel plantar puede llegar a transducir los ganglios de la raíz dorsal, seguramente debido a que se transporta retroaxonalmente (Homs, 2010). Pero a pesar de estos datos, es necesario tener en cuenta que en muchas de las enfermedades que afectan el SNP, el transporte retrogrado axonal está

alterado, con lo que se podría anular esta vía de entrada del virus (Murakami *et al.*, 2001).

Por todas estas consideraciones, se decidió que la mejor vía para la administración de los vectores AAV era la inyección intratecal para abarcar una mayor área. Se han inyectado intratecalmente los serotipos AAV1, 2 y 5, mostrando una mejor transducción únicamente en neuronas sensoriales con AAV1, seguido por AAV5 y siendo casi imperceptible la de AAV2 (Ciron *et al.*, 2009). Apoyando estos resultados, otros trabajos donde se ha administrado AAV1 únicamente han mostrado transducción elevada de este tipo neuronal (Hollis *et al.*, 2008; Iwamoto *et al.*, 2009). También se ha demostrado que AAV8 transduce neuronas sensoriales por la misma vía de administración (Storek *et al.*, 2006; Storek *et al.*, 2008).

De hecho, con vectores adenoasociados sólo se han conseguido transducir neuronas motoras eficientemente en médula espinal, mediante inyección intramuscular con AAV6 y AAV8, a través de transporte retroaxonal (Towne *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2010), o mediante administración intravenosa de AAV9 (Duque *et al.*, 2009). Resultados de nuestro grupo después de la inyección intratecal con AAVrh10, mostraban una transducción generalizada, donde se podía observar la expresión del transgén, tanto en el 50% de las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal como en el 25-30% de las motoneuronas de la médula espinal. Además no sólo se transducían las neuronas de la región dorsal sino también torácicas y cervicales (Homs, 2010).

Para testar si la administración exógena de NRG1typeIII era capaz de recuperar las alteraciones moleculares demostradas en los ratones diabéticos administramos intratecalmente AAVrh10-NRG1typeIII en un modelo de ND. Comprobamos que la expresión de NRG1typeIII en ganglios de la raíz dorsal y en médula espinal, alcanzaba el 80 y el 60% de expresión respectivamente respecto a los animales controles, induciendo un aumento en la fosforilación de Akt en los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII respecto a los animales controles, lo que nos estaba indicando que la vía de señalización mediante los receptores ErbB, vía PI3 quinasa y Akt estaba activada, tal y

como se describió en el trabajo del grupo de Yarden (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1998). En cambio, no se observaron cambios significativos en la fosforilación de la quinasa p42/44, respecto a los animales inyectados con el vector viral irrelevante (datos no mostrados).

La sobreexpresión de NRG1typeIII en ratones diabéticos también restaura los niveles de las proteínas de la mielina en un 60-80%. En cuanto a los factores de transcripción, se pudo observar como se corregían los niveles para Sox10 y Egr2, llegando a estar al mismo nivel que los controles, y las moléculas correguladoras de Egr2, nab1 y nab2, alcanzaban unos niveles prácticamente normales. Para Egr2 obtuvimos resultados consistentes mediante WB, sin embargo los anticuerpos utilizados para detectar Sox10 no funcionaron, por lo que queda pendiente de análisis.

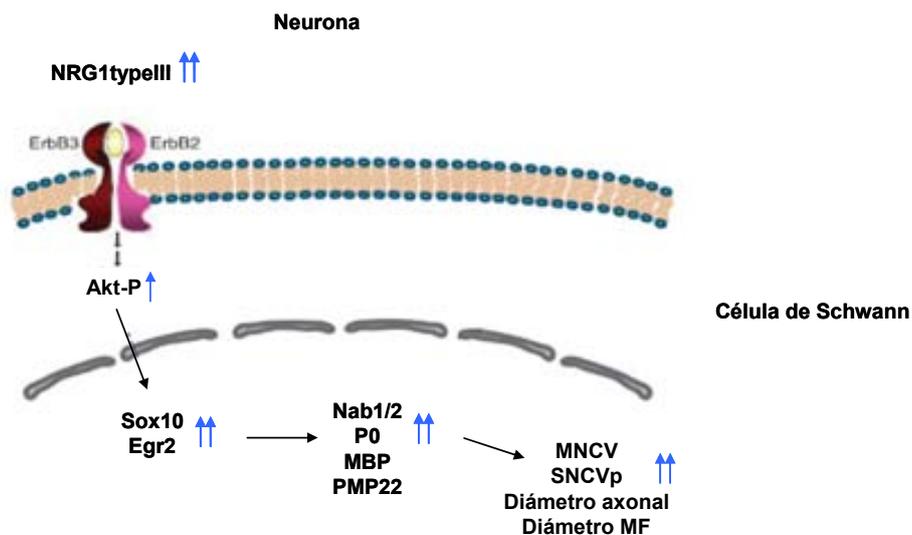
Estos resultados se veían reflejados en el análisis electrofisiológico de los animales inyectados con los vectores adenoasociados, donde había una mejora del 20%, estadísticamente significativa, tanto en la velocidad de conducción sensorial en la parte proximal del nerviosa (SNCVp) como en la motora (MNCV), correlacionando directamente estos resultados con el aumento de la expresión de NRG1typeIII tanto en neuronas sensoriales como motoras. Estos niveles alcanzados eran prácticamente los mismos que se pueden observar para los animales ICR controles (Homs *et al.*, 2010b) (Ver **Anexo 2**).

En los resultados morfométricos, el diámetro axonal y de las fibras mielínicas era significativamente mayor en los animales inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII, con un aumento del 15 y el 13,6% respectivamente, aún teniendo un número similar de fibras mielínicas en los dos tipos de animales. También se observó un aumento del 12% en el grosor de la mielina, que aunque no es estadísticamente significativo se puede relacionar directamente con los resultados obtenidos para las proteínas de la mielina y el papel promielinizante de NRG1typeIII (Chen *et al.*, 2006). Además, encontramos una disminución significativa en el número de fibras degeneradas, que también puede relacionarse con la sobreexpresión del transgén y su papel en la supervivencia neuronal y de la células de Schwann (Adlkofer and Lai, 2000).

Además, estas observaciones corroboran los resultados obtenidos en las electrofisiologías, ya que el aumento en la velocidad de conducción nerviosa sensorial y motora está directamente relacionado con el diámetro axonal y de las fibras mielinizadas (Rushton, 1951).

A pesar de que la inyección de los vectores virales se ha realizado cuando la afectación a nivel de mRNA era ya bastante elevada, hemos podido revertir al menos en un 60% el efecto de la hiperglucemia sobre la expresión de NRG1typeIII, las proteínas de la mielina y los factores de transcripción implicados en mielinización. Probablemente con tiempos de expresión más largos del transgén se conseguirían resultados aún más significativos, tanto a nivel molecular como fisiológico e histopatológico.

A continuación, quedan resumidos los resultados obtenidos tras la transducción específica de neuronas sensoriales y motoras con AAVrh10-NRG1typeIII (**Figura 63**), y nos indican que la administración específica de este vector ha revertido en buena parte los déficits en la expresión que habíamos observado para las proteínas de la mielina y factores promielinizantes en las células de Schwann, y este resultado se ve reflejado en la mejora tanto de la velocidad de conducción motora y sensorial como en el diámetro axonal y de las fibras nerviosas.



**Figura 63.** Esquema de los resultados obtenidos tras la administración de AAVrh10-NRG1typeIII en un modelo de neuropatía diabética

Existen diferentes trabajos publicados en cuanto al papel desmielinizante que también puede ocasionar la vía de NRG-ErbB. Es esencial estudiarlos a fondo y darse cuenta de la importancia de las diferentes isoformas de NRG1 y del papel que jugaría el dominio EGF-like en la vía de señalización.

En concreto, en el trabajo publicado por el grupo de Carroll, observan una neuropatía hipertrófica que provoca una parálisis parcial en las extremidades de ratones transgénicos que sobreexpresan NRG1 específicamente en SC (Huijbregts *et al.*, 2003). En este caso el factor promielinizante se está expresando en el tipo celular incorrecto, ya que de forma natural se expresa en células neuronales y este hecho ya puede estar induciendo una función aberrante de la proteína. Además, la isoforma utilizada es NRG1typeII también llamada *glial growth factor* (GGF) y con el dominio EGF-like  $\beta 3$ . Utilizando la misma isoforma también se describió desmielinización en cocultivos de SC y neuronas sensoriales que estaban completamente mielinizados antes de la adición de GGF (Zanazzi *et al.*, 2001).

Más recientemente y utilizando una forma soluble de NRG1 que contiene la zona común a todas las isoformas de NRG1 que se han utilizado en este trabajo, el dominio EGF-like del tipo  $\beta 1$  y los aminoácidos conservados de su alrededor, también se observó desmielinización en cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias (Yu *et al.*, 2008). La utilización de la forma soluble de NRG1 $\beta 1$  puede dar lugar a resultados diferentes a si se utilizan las secuencias completas de cada isoforma pues en ellas existen zonas específicas que podrían dar lugar a la activación a su vez de diferentes vías de señalización. En el caso de NRG1typeIII, una vez procesada por BACE, sigue anclada a la membrana neuronal y se ha sugerido que una vez activado el receptor ErbB en las SC, a su vez también estaría generando una señal autocrina de supervivencia de la propia neurona, que la forma soluble no podría generar (Falls, 2003). En el trabajo del grupo de Corfas (Chen *et al.*, 2006), la utilización de líneas establecidas que expresan de forma constante NRG1typeI no generaban ningún efecto en la expresión de las proteínas de la mielina. En nuestro caso, incluso el constructo de la forma extracelular de NRG1typeIII

posee el dominio transmembrana unido al EGF-like por lo que la señalización dentro de la neurona podría seguir actuando.

Además, el grupo de Salzer ya describió que aunque en general la vía de p42/44 y también PI3 quinasa promovían la supervivencia de los diferentes tipos celulares, su efecto en las SC dependía de su estado de desarrollo (Maurel and Salzer, 2000). La activación de la vía de señalización PI3 quinasa sería crítica para la progresión desde la forma inmadura de SC hasta la SC mielinizante, y sin embargo la vía p42/44 podía inhibir el desarrollo hasta SC mielinizante (Ogata *et al.*, 2004).

Hasta ahora, no se conocía si cada isoforma de NRG1 podía desencadenar un tipo de señalización específica, el hecho de que haya un *splicing* alternativo tan amplio y que se hayan observado diferentes resultados con las distintas isoformas, hacía pensar que cada NRG1 podría ejercer un papel diferente y activar una vía de señalización diferente, según el momento del desarrollo. En el trabajo del grupo de Cabedo, sobreexpresan NRG1typeIII  $\beta 3$  específicamente en neuronas y únicamente observan cambios drásticos en la estructura de las *Remak bundles* debidos a una dramática proliferación de las SC no mielinizantes que llevan al desarrollo de depósitos de colágeno y tumores en algunos ratones (Gomez-Sanchez *et al.*, 2009). Al analizar la señalización inducida por esta isoforma observan tanto activación de la vía Akt como de p42/44 y no observan ningún cambio en el grosor de la mielina de los axones con diámetro mayor. Concretamente en nuestros experimentos hemos observado activación de la vía PI3 quinasa pero no de la vía p42/44, cuando se ha utilizado específicamente la isoforma NRG1typeIII, con el dominio EGF-like del tipo  $\beta 1$ .

Muy recientemente se han publicado dos trabajos en los que han demostrado que efectivamente NRG1typeII y typeIII activan vías de señalización diferentes. Mientras que NRG1typeII presenta un patrón similar a la forma soluble NRG1 $\beta 1$  activando la vía PI3 quinasa mediante fosforilación de Akt y Erk, NRG1typeIII señala mediante fosforilación de Akt y es la única que activa NF-kB. Como resultado de esta diferente activación, NRG1typeII induce

desmielinización en los cultivos mientras que NRG1typeIII estimula la mielinización e incluso rescata el fenotipo desmielinizante en los cocultivos de SC y neuronas sensoriales primarias de los ratones NRG1typeIII<sup>+/-</sup> (Limpert and Carter, 2010; Syed *et al.*, 2010).

Al buscar tratamientos alternativos para la ND hay que tener en cuenta diferentes aspectos, pero sobretodo, la gran variedad de factores causales y contribuyentes en la patogenia y en toda la sintomatología presente en la ND. Hasta ahora, la parte fundamental del esquema terapéutico en los pacientes con diabetes es el control de los niveles de glucosa y de insulina, pero no es suficiente pues los pacientes acaban desarrollando las complicaciones. Incluso y como hemos comentado anteriormente, los pacientes diabéticos que han recibido transplante de páncreas igualmente acaban desarrollando ND.

Entre los fármacos más utilizados para el tratamiento de la complicación, encontramos los inhibidores del enzima aldosa reductasa. Aunque en ensayos preclínicos los resultados observados eran prometedores, en cuanto a la mejoría en el estrés oxidativo y en apoptosis celular, incluso en la velocidad de conducción nerviosa, los resultados en los ensayos clínicos mostraban unas leves mejorías en los pacientes (Gidal, 2006; Schemmel *et al.*, 2009; Shimoshige *et al.*, 2009). También se han testado los efectos beneficiosos de diferentes moléculas antioxidantes en diferentes modelos murinos, mostrando mejoría en la velocidad de conducción nerviosa aunque sólo en un 5-10% (Vallianou *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2006).

Muchos de los esfuerzos terapéuticos se han centrado en encontrar medicamentos paliativos para el dolor neuropático, uno de los síntomas de la ND. Aunque algún medicamento como la licosamida ha disminuido significativamente la sensación del dolor en algunos pacientes, no son ni mucho menos definitivos (Rauck *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2010). También se ha descrito la utilización de terapias con factores neurotróficos en modelos murinos de ND donde se observaba una mejora de las funciones neuronales y se restauraba parte del déficit neurotrófico (Christianson *et al.*, 2003a; Liu *et al.*, 2009a). Desgraciadamente estos tratamientos son solamente útiles para

algunos pacientes, y cada vez se tienen más evidencias que éste tiene que ser completamente personalizado y según la sintomatología del paciente debe ser diferente (Jensen *et al.*, 2009; O'Connor and Dworkin, 2009).

Actualmente, la terapia génica es una de las disciplinas de la biomedicina que presenta aplicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades genéticas y adquiridas y para la vacunación

Para que los ensayos de terapia génica para enfermedades crónicas tengan éxito, es necesario que la expresión del gen terapéutico se mantenga durante gran parte de la vida del paciente a niveles terapéuticos, para revertir el fenotipo de la enfermedad. Para ello, es imprescindible el desarrollo de vectores seguros que permitan la expresión del transgén durante un plazo largo y que evite la respuesta inmune del paciente, punto imprescindible para que estos vectores puedan ser utilizados en protocolos de terapia génica *in vivo*.

Existen dos tipos de vectores, los virales y los no virales, siendo los primeros los más utilizados por su potencial eficiencia de transducción de las células diana y por permitir una elevada expresión del gen terapéutico.

Los vectores adenoasociados se empezaron a utilizar en diferentes ensayos clínicos para diferentes enfermedades como vectores de terapia génica porque comparados los adenovirus no activaban una respuesta inmune del huésped (Manno *et al.*, 2003; Flotte, 2005; Kaplitt *et al.*, 2007; Brantly *et al.*, 2009). Aunque recientemente se ha encontrado que sí estimulan la respuesta inmune cuando infectan a células dendríticas (Sabatino *et al.*, 2007; Lorain *et al.*, 2008). Resultados de nuestro grupo muestran que la administración de AAVrh10 no induce la producción de anticuerpos neutralizantes en los animales transducidos (Homs, 2010), dato que nos indica que seguramente este serotipo no transduce células dendríticas ya que sí se han encontrado anticuerpos neutralizantes para los serotipos que infectan este tipo celular (Lorain *et al.*, 2008). Para confirmar estos datos, realizamos infecciones de células dendríticas con este serotipo para analizar sus niveles de transducción.

En definitiva, la administración de genes como NRG1typeIII de manera selectiva en SNP puede conducir a diferentes aplicaciones importantes dentro del campo de la terapia génica y podría aportar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurológicas como la ND donde está afectada la mielinización, la atrofia muscular espinal, la esclerosis lateral amiotrófica o las diferentes neuropatías hereditarias, así como también para el tratamiento del dolor. No obstante, sería adecuado expresar NRG1typeIII de forma regulada para evitar la sobreexpresión generalizada de este factor.

## ***CONCLUSIONES***



1. El aumento de la concentración de glucosa induce una disminución en la expresión y una downregulación del promotor de la principal proteína de la mielina (P0), en cultivos primarios y establecidos de células de Schwann.
2. El aumento de la concentración de glucosa induce una disminución de las proteínas de la mielina P0, MBP y PMP22, y de los factores implicados en mielinización, Sox10, Egr2 y sus correguladores nab1 y nab2, en cocultivos de células de Schwann y neuronas sensoriales primarias.
3. La hiperglucemia induce una disminución de las proteínas de la mielina P0, MBP y PMP22, y de los factores de transcripción implicados en mielinización Sox10, Egr2 y sus correguladores nab1 y nab2, en los nervios ciáticos de ratones ICR adultos a semana 1 después de la inducción de la diabetes y también en ICR jóvenes y NOD diabéticos.
4. El aumento de la concentración de glucosa induce una disminución de NRG1typeIII en cocultivos de células de Schwann y neuronas sensoriales primarias, en cultivos de neuronas sensoriales purificadas y en cultivos de motoneuronas.
5. La hiperglucemia induce una disminución de NRG1typeIII en ganglios de la raíz dorsal y en médula espinal de ICR adultos tres días después de la inducción de la diabetes y también en ICR jóvenes y NOD diabéticos.
6. Los vectores lentivirales y adenoasociados generados para las tres isoformas de NRG1 con la secuencia completa o únicamente con el dominio extracelular son funcionales *in vitro* en cocultivos de HEK293 y células de Schwann primarias.
7. La eficiencia de transducción de los cocultivos de células de Schwann y neuronas sensoriales es mayor con AAVrh10 que con otros serotipos de AAVs testados, y AAVrh10 transduce específicamente neuronas sensoriales en cultivos organotípicos de ganglios de la raíz dorsal.
8. Tanto AAVrh10 como los lentivirus infectan eficientemente los cultivos de neuronas purificados.

- 9.** Mediante administración intratecal de AAVrh10-NRG1typeIII se ha demostrado que la sobreexpresión de NRG1typeIII en ganglios de la raíz dorsal y en médula espinal, activa la vía de señalización en los nervios ciáticos de los animales inyectados.
  
- 10.** Los animales diabéticos inyectados con AAVrh10-NRG1typeIII, recuperan en un 80% la expresión de las proteínas de la mielina P0, MBP y PMP22, y entre un 90-100% la expresión de los factores de transcripción Sox10, Egr2 y sus correguladoras nab1 y nab2.
  
- 11.** Los animales diabéticos tratados con AAVrh10-NRG1typeIII muestran un aumento del 20% en la velocidad de conducción nerviosa motora y sensorial, respecto a los animales controles.
  
- 12.** Los nervios tibiales de los animales diabéticos tratados con AAVrh10-NRG1typeIII muestran un aumento del 15% en el diámetro axonal y de las fibras mielinizadas, respecto a los animales controles.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## 1. MATERIALES

### 1.1. VECTORES PLASMÍDICOS

Los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo son, pAAVCAG-PLK-WPRE, pAAVCAG-PLK-GFP-WPRE (generado en nuestro laboratorio), pCIneo, pBSK-WPRE (Donello *et al.*, 1998), pCI-neo-WPRE (generado en nuestro laboratorio), pGG2, pGG2-WPRE (generado en nuestro laboratorio), pCDNA3-NRG1typeIIIECD/FL, pCDNA3-NRG1typeIECD/FL, pCDNA3-NRG1typeIECD/FL (las 6 construcciones cedidas por el Dr. Corfas del Children's Hospital de Harvard), pGG2-NRG1typeIIIECD/FL-WPRE, pGG2-NRG1typeIECD/FL-WPRE, pGG2-NRG1typeIECD/FL-WPRE (las 6 construcciones generadas en nuestro laboratorio), pWPT-GFP, pWPT-NRG1typeIIIECD/FL, pWPT-NRG1typeIECD/FL, pWPT-NRG1typeIECD/FL (las 6 construcciones generadas en nuestro laboratorio), pXX6, pRep2Cap1, pRep2Cap9 (Fisher *et al.*, 1996), pSPAX2 y pMD2G (Naldini *et al.*, 1996).

### 1.2. CULTIVOS CELULARES

Para realizar los correspondientes análisis *in vitro* del efecto de las diferentes concentraciones de glucosa sobre la expresión de las proteínas de la mielina, se utilizaron dos líneas celulares de células de Schwann (SC) establecidas, RT4-D6P2T y S16. La primera es una línea celular tumoral de células de Schwann de rata y la segunda una línea celular también de células de Schwann de rata en este caso inmortalizadas (Sasagasako *et al.*, 1996).

Las RT4-D6P2T derivan de una línea celular que se estableció inicialmente como RT4-D (Hagiwara *et al.*, 1993), posteriormente se obtuvo un clon RT4-D6 y de éste un subclon RT4-D6P2T que se corresponde con la línea celular utilizada. Durante todo el trabajo nos referiremos a este clon como RT4.

Se conoce que RT4 y S16 tienen unos niveles de expresión de proteínas mielinizantes similares a los niveles presentes en nervio ciático de ratón adulto.

Ambas expresan PMP22 y P0. MAG (*myelin associated protein*) y MBP (*myelin basic protein*) sólo están expresadas en S16 (Hai *et al.*, 2002).

Además se utilizaron cultivos primarios de SC de ratón, cultivos primarios de neuronas sensoriales y cocultivos de SC con neuronas sensoriales para testar también el efecto de la concentración de glucosa sobre la expresión de proteínas de la mielina y genes involucrados en mielinización.

Para la producción de los virus adeno-asociados (AAV) se utiliza la línea celular HEK-293. En concreto los AAVs se producen a partir de un clon de esta línea celular llamado 293-AAV (Stratagene). Para la producción de los vectores lentivirales (LV) también la misma línea pero el clon llamado 293-T (Stratagene), esta variante contiene el antígeno largo T-SV40, para la replicación de los plásmidos que contienen el origen de replicación SV40. Ambas líneas, nos permiten obtener una elevada eficiencia de producción de los correspondientes vectores.

Para testar la expresión del transgén procedente de las construcciones plasmídicas y de los vectores virales, se utiliza otro clon de 293, las 293-QB (Q-BIOgene). Además, se utilizaron cocultivos de estas células y SC primarias de rata para testar la funcionalidad de todos los vectores virales, tanto los AAV como los LV.

### **1.3. ANIMALES**

Se utilizaron ratones ICR machos entre 8 y 12 semanas de edad, crías entre P3-5 (edad postnatal) y a P18 y embriones E13,5 (edad embrionaria). NOD machos y hembras una vez desarrollada la diabetes y crías entre P3-5 de rata *Sprague Dawley*. Los animales fueron alimentados *ad-libitum* con una dieta estándar (PanLab, España) y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas de duración.

Los experimentos con animales se realizaron según la legislación vigente y con la aprobación del comité de ética y experimentación animal y humana de la UAB.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DNA**

#### **2.1.1. Minipreparación de DNA plasmídico**

Para la obtención de DNA plasmídico, se realizan minipreparaciones de DNA mediante lisis alcalina de un precultivo de bacterias y su posterior precipitación con isopropanol. Se parte de cultivos de 3ml del correspondiente medio selectivo que ha sido inoculado con colonias aisladas crecidas previamente en placas LB-agar selectivas. Mediante esta técnica se obtiene DNA plasmídico en bajas cantidades (5-15 $\mu$ g) y poca pureza pero suficiente para poder realizar digestiones con enzimas de restricción o amplificar por PCR.

*Reactivos:* Medio LB líquido (Luria Broth (Miller's LB Broth) de Conda) con ampicilina a 100 $\mu$ g/ml (USB). Isopropanol y etanol absoluto (Panreac). *Solución de resuspensión (4°C):* 50mM Tris-HCl (Sigma) pH8,0, 10mM EDTA (USB), 100 $\mu$ g/mL RNAsa (Sigma); *Solución de lisis:* 200mM NaOH (Panreac), 1% SDS (w/v) (USB); *Solución de precipitación protéica (4°C):* 3M acetato potásico pH=5,5 (Panreac).

*Procedimiento:* Se pelletea el cultivo bacteriano mediante centrifugación durante 1 minuto a 12000g, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 200 $\mu$ l de solución de resuspensión. Se añaden 400 $\mu$ l del tampón alcalino de lisis, se invierte varias veces y se incuba 5' a temperatura ambiente. Se neutraliza mediante adición de 400 $\mu$ l de la solución de acetato potásico para precipitar las proteínas. Se invierte hasta conseguir una suspensión homogénea y se incuba a 0°C durante 10'. Se centrifuga 10' a 12000g y se

traspasa el sobrenadante. Para precipitar el DNA plasmídico se añaden 0,6 volúmenes de isopropanol y se incuba la solución durante 10' a temperatura ambiente. Después se centrifuga durante 10' a 12000g, y se descarta el sobrenadante. Se realiza un lavado con 400µl de etanol 70% (v/v) y se centrifuga 8' a 12000g. Se descarta el sobrenadante, se deja secar el precipitado y se resuspende en 30µl de agua MiliQ.

### **2.1.2. Maxipreparación de DNA plasmídico**

Para la obtención de DNA plasmídico en cantidades elevadas (250-1000µg) se ha utilizado el kit comercial E.Z.N.A<sup>TM</sup> Fasffilter (Omega Bio-Tek), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. La preparación obtenida tiene una pureza adecuada para la transfección de células en cultivo.

*Procedimiento:* Se parte de 200ml de cultivo, tras una lisis alcalina de las bacterias y posterior precipitación con acetato potásico, el DNA se purifica por cromatografía de intercambio iónico en columna y se precipita con isopropanol.

### **2.1.3. Megapreparación de DNA plasmídico**

Para la obtención de DNA plasmídico en cantidades elevadas (1g-2g) se ha utilizado el kit comercial Plasmid Mega Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. La preparación obtenida tiene una pureza adecuada para la transfección de células en cultivo.

*Procedimiento:* Se parte de 2l de cultivo, tras una lisis alcalina de las bacterias y posterior precipitación con acetato potásico, el DNA se purifica por cromatografía de intercambio iónico en columna y se precipita con isopropanol.

### **2.1.4. Clonaje por ligación**

Esta tecnología se basa en unir dos segmentos de DNA para generar una única molécula capaz de replicarse de forma autónoma en una bacteria.

*Procedimiento:* Para preparar vector e inserto para ser ligados, se digieren con enzimas de restricción (Fermentas y New England Biolabs), posteriormente se separan las bandas de interés mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) (Amresco) en tampón TAE 1X (TAE 50X: 2M Tris base (Sigma), 0,05M EDTA (USB), ácido acético glacial (Panreac), pH 8,5), aplicando 110V durante 75'. El tampón de carga utilizado (10x) contiene 50% glicerol (v/v) (Panreac), 1% SDS (p/v) (USB), 0,1% Bromophenol Blue (p/v) (Sigma), 100mM EDTA pH 8 (USB); y el marcador de pesos molecular *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas). Para visualizar los fragmentos de DNA se tiñe el gel con una solución con bromuro de etidio (6µg/ml) (Invitrogen) durante 10' en agitación, posteriormente se expone el gel en un transiluminador de UV (Syngene). Las bandas de DNA de interés se purifican mediante el kit *GeneClean TurboKit* (Q-BIOgene) y se cuantifican por espectrofotometría (1 unidad de  $DO_{260}$  se corresponde con una concentración de 50µg de DNA/mL) con Nanodrop (NanoDrop Technologies).

Cuando el vector se digiere sólo con un enzima, con dos enzimas que generan extremos romos o compatibles, se tiene que realizar una defosforilación de los extremos para evitar la religación. Normalmente se utiliza 1µl de TSAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) (Promega), se incuba 1h a 37°C y después se inactiva por calor a 74°C durante 15'. Para la catálisis de la reacción de ligación utilizamos la T4DNA ligasa (New England Biolabs). Es habitual utilizar 50ng del vector por reacción de ligación. Para calcular la cantidad molar equivalente del inserto hay que conocer la relación de medidas entre vector e inserto, multiplicando 50ng por esta relación sabremos los ng de inserto equivalentes a esa cantidad de vector. Además de la condición equimolar (1:1), utilizamos otra relación donde existe un exceso de inserto en relación al vector (1:3). Para los controles normalmente se hace una reacción sin ligasa para determinar la cantidad de vector sin digerir y una condición con vector y ligasa sin inserto para determinar la eficiencia de la TSAP.

Las reacciones de ligación se realizan a 16°C O/N. Posteriormente las ligaciones se transforman en células *E.coli* TOP10 (Invitrogen)

quimiocompetentes mediante *heat shock* y se siembran en placas de LB-agar con el antibiótico correspondiente, se incuban a 37°C O/N. Seguidamente se inoculan a partir de colonias individuales precultivos de medio LB más el antibiótico de selección y se incuban O/N a 37°C en agitación. A partir de las bacterias del precultivo se extrae el DNA plasmídico y se analiza si se ha producido la introducción del inserto en el vector correctamente por digestión con enzimas de restricción.

A continuación se adjunta la tabla con los clonajes realizados para la generación de los plásmidos utilizados para la producción de los vectores virales.

Construcción final	Origen del vector	Origen del inserto
<b>A.</b> pCIneo-WPRE-B11	pCIneo digerido con EcoRI+Sall	pBSK-WPRE-B11 digerido con EcoRI+Sall
<b>B.</b> pGG2-WPRE-B11	plásmido <b>A</b> digerido con XhoI+NotI	pGG2 digerido con XhoI+NotI
<b>C.</b> pGG2-NRG1typeIIIECD-WPRE-B11	plásmido <b>B</b> digerido con BglII+NheI	pCDNA3-NRG1typeIIIECD digerido con pBglII+XbaI
<b>D.</b> pGG2-NRG1typeIIIFL-WPRE-B11	plásmido <b>B</b> digerido con BglII+NheI	pCDNA3-NRG1typeIIIFL digerido con pBglII+XbaI
<b>E.</b> pGG2-NRG1typeIIECD-WPRE-B11	plásmido <b>B</b> digerido con BglII+NheI	pCDNA3-NRG1typeIIECD digerido con pBglII+XbaI
<b>F.</b> pGG2-NRG1typeIIFL-WPRE-B11	plásmido <b>B</b> digerido con BglII+NheI	pCDNA3-NRG1typeIIFL digerido con pBglII+XbaI
<b>G.</b> pGG2-NRG1typeIECD-WPRE-B11	plásmido <b>B</b> digerido con BglII+NheI	pCDNA3-NRG1typeIECD digerido con pBglII+XbaI
<b>H.</b> pGG2-NRG1typeIFL-WPRE-B11	plásmido <b>B</b> digerido con BglII+NheI	pCDNA3-NRG1typeIFL digerido con pBglII+XbaI
<b>I.</b> pWPT-NRG1typeIIIECD-WPRE-B11	pWPT-GFP digerido con BamHI+MfeI	plásmido <b>C</b> digerido con pBamHI+EcoRI
<b>J.</b> pWPT-NRG1typeIIIFL-WPRE-B11	pWPT-GFP digerido con BamHI+MfeI	plásmido <b>D</b> digerido con pBamHI+EcoRI
<b>K.</b> pWPT-NRG1typeIIECD-WPRE-B11	pWPT-GFP digerido con BamHI+MfeI	plásmido <b>E</b> digerido con pBamHI+EcoRI
<b>L.</b> pWPT-NRG1typeIIFL-WPRE-B11	pWPT-GFP digerido con BamHI+MfeI	plásmido <b>F</b> digerido con pBamHI+EcoRI
<b>M.</b> p6600-NRG1typeIECD-WPRE-B11	p6600 digerido con Kpn+HpaI	plásmido <b>G</b> digerido con Kpn+HpaI
<b>N.</b> p6600-NRG1typeIFL-WPRE-B11	p6600 digerido con Kpn+HpaI	plásmido <b>H</b> digerido con Kpn+HpaI
<b>Ñ.</b> pWPT-NRG1typeIECD-WPRE-B11	pWPT-GFP digerido con MluI+MfeI	plásmido <b>M</b> digerido con MluI+EcoRI
<b>O.</b> pWPT-NRG1typeIFL-WPRE-B11	pWPT-GFP digerido con MluI+MfeI	plásmido <b>N</b> digerido con MluI+EcoRI

**Tabla 4.** Esquema de los pasos de clonaje. La letra “p” delante de los enzimas indica que se ha tenido que realizar digestión parcial del plásmido porque el inserto tenía una diana interna.

### 2.1.5. Preparación de bacterias quimiocompetentes

Para poder transformar las bacterias, éstas han de adquirir la habilidad de poder introducir el DNA. Las células utilizadas son quimiocompetentes TOP10 (Invitrogen).

*Reactivos:* *E.coli* TOP10; *TFB1*: 100mM cloruro de rubidio (Fluka), 50mM cloruro magnésico (Sigma), 30mM acetato potásico (Panreac), 10mM cloruro cálcico (Sigma), 15% glicerol (Panreac), pH=5,8 (HCl); *TFB2*: 10mM MOPS (Fluka), 10mM cloruro de rubidio (Fluka), 75mM cloruro cálcico (Sigma), 15% glicerol (Panreac), pH=6,8 (HCl). Los dos tampones son esterilizados mediante filtros de 0,22µm (Millex).

*Procedimiento:* Se inoculan 200ml de LB a partir de 5µl de células. Se incuba el cultivo a 37°C en agitación hasta que llegue a fase exponencial de crecimiento a una densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de 0,5. Después de una incubación en hielo durante 5' se pasa el cultivo a Falcons de 50ml y se centrifugan 5' a 4000g a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el *pélllet* en 30ml de TFB1 por cada 100ml de cultivo y se incuba en hielo durante 90'. Posteriormente se centrifugan 5' a 4000g a 4°C, se decanta el sobrenadante y se resuspende el *pélllet* en 4ml de TFB2 por cada 100ml de cultivo original. Finalmente se hacen alícuotas de 100µl en eppendorfs fríos (-80°C), manteniéndolos en nieve carbónica y se almacenan a -80°C.

### 2.1.6. Transformación bacteriana

La transformación es la introducción del DNA plasmídico dentro de la célula bacteriana, se realiza por choque térmico.

*Reactivos:* placas (Nunc) de LB-agar (Luria Broth (Miller's LB Broth)(Conda), agar (Panreac) con ampicilina a 100µg/ml (USB), medio LB líquido con y sin ampicilina.

*Procedimiento:* Se descongelan los viales de células quimiocompetentes en hielo durante 10' y se le añade 5µl de la reacción de ligación. Se dejan 30' en hielo y posteriormente se realiza el *heat shock*, manteniendo los viales durante 45'' a 42°C y después poniéndolos en hielo durante 2'. Se le añade a cada vial 200µl de LB sin antibiótico y se incuban 1h a 37°C en agitación permitiendo así la recuperación de las bacterias y la síntesis de las proteínas del plásmido entre ellas la que le conferirá la resistencia al antibiótico. Se siembran las células en placas con ampicilina y se incuban O/N a 37°C.

## **2.2. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA**

El RNA es muy sensible a la acción de las RNAsas, por tanto es muy importante utilizar material libre de RNAsas, preparar las soluciones con agua-DEPC y trabajar siempre con guantes.

### **2.2.1. Extracción del RNA**

*Reactivos:* Trizol (Invitrogen), Qiazol (Qiagen), dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma), pistilos (Eppendorf).

*Procedimiento:* Para la preparación del agua-DEPC se pone el volumen necesario de agua en un recipiente libre de RNAsas (vidrio pyrex, 3h a 250°C), se le añade el DEPC hasta 0,01% (v/v), se deja O/N a 37°C y posteriormente se autoclava dos veces para inhibir el DEPC. Para la extracción de RNA de células en cultivo, se lisan añadiendo 1ml de Trizol por cada 10cm<sup>2</sup>, pasando el lisado celular varias veces por la pipeta. Para la extracción de RNA de tejidos de SNP, se añade 1ml de Qiazol (se utiliza para tejidos con alto contenido en lípidos) por gramo de tejido y se homogeniza completamente con pistilos. Para las muestras de tejido se realiza una centrifugación de 10' a 12000g a 2-8°C para eliminar los restos de tejido. En ambos casos se incuban las muestras 5' a 15-30°C (para la disociación de los complejos nucleoproteícos) y se les añade 0,2ml de cloroformo por cada ml de Trizol/Qiazol utilizado, se agitan 15'' con vórtex y se incuban 2-3' a 15-30°C. Se centrifugan 15' a 12000g a 2-8°C, seguidamente se recupera la fase acuosa de cada muestra y se añade 0,5ml

de isopropanol por cada ml de Trizol/Qiazol utilizado. Después de una incubación de 10' a 15-30°C, se precipita el RNA centrifugando 10' a 12000g a 2-8°C, se decanta el sobrenadante y se realiza un lavado del *péllet* con etanol al 70% (con agua tratada con DEPC) a razón de 1ml por cada ml de Trizol/Qiazol utilizado, se mezclan con vórtex y se centrifugan 5' a 7500g a 2-8°C. Se decanta el sobrenadante y una vez seco el *péllet* de RNA, se resuspende con agua pretratada con DEPC, pasando la solución unas cuantas veces por la pipeta e incubando 10' a 55-60°C. Finalmente se mide la concentración espectrofotométricamente con Nanodrop y se almacena a -80°C.

### **2.2.2. Análisis del RNA por real-Time PCR**

La PCR en tiempo real (real-time PCR) se utiliza para cuantificar diferencias en la expresión de mRNA. La técnica se basa en la utilización de un termociclador espectrofluorométrico y una molécula llamada **sybrgreen** que se intercala en las cadenas dobles de DNA (dsDNA) y no en el DNA de cadena sencilla (ssDNA). Al unirse al dsDNA emite fluorescencia que el termociclador detectará durante la reacción de PCR en la fase de elongación de las cadenas. Para proceder a la cuantificación del mRNA hay que obtener el RNA total de la muestra a analizar, proceder a la retrotranscripción de los mRNAs utilizando un primer poliT (oligodT) que se unirá a las colas poliA retrotranscribiendo únicamente estos RNAs. Posteriormente con el cDNA obtenido se realiza la reacción de real-time PCR.

*Reactivos:* Omniscript RT Kit (Qiagen), oligodT (Invitrogen), RNase inhibitor (Qiagen), FastStart Sybrgreen Master (Fermentas), Smart Cycler reaction tubes (Cepheid), Termociclador espectrofluorométrico Smart Cycler II (Cepheid).

*Primers:*

	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer revers</b>
<b>r36B4</b>	atggatacaaaagggctctggc	agccgcaaatgcagatggatc
<b>m36B4</b>	atgggtacaagcgcgtcctg	agccgcaaatgcagatggat
<b>NRG1typelll</b>	ttcccttctccagctcggacc	gtcccagtcgtggatgtagatg
<b>P0</b>	ttcaggtcacgctctatgtc	caggtagaagagcaacagcag
<b>MBP</b>	gggtgcgccaagcggggc	acttctggggcagggagcc
<b>PMP22</b>	ctctgttggggatcctgttc	aaggcggatgtgttacagttc
<b>MAG</b>	agcacagcgtcctggacatc	ggcccagccagctcagctc
<b>Sox10</b>	ccagagcaccctcaggcca	ttgccgaagtgcgtagtggggc
<b>Egr2</b>	gaactgggaggcccctttg	cagagatgggagcgaagctac
<b>nab1</b>	tccgagtgtgcagaaccgac	tccaaggtgaatgcagagtgag
<b>nab2</b>	agcccctgtgtgcctgcaag	gcctccactttaacgctgctc

**Tabla 5.** Primers utilizados para la PCR cuantitativa. “r” o “m” delante del nombre de cada primer indican la especie de origen, rata o ratón respectivamente. Los otros primers se pueden utilizar para amplificar secuencias de las dos especies.

*Procedimiento:* Para poder analizar por real-time los RNAs extraídos, primero se retrotranscribe cada muestra de RNA. Partiendo de 1µg de RNA y mediante la utilización del Omniscript RT Kit, oligodT y RNase inhibitor, se obtiene el cDNA de cada muestra siguiendo el protocolo adjuntado en el kit. Posteriormente, utilizando una dilución 1/10 de cada cDNA, el FastStart Sybrgreen Master y el par de primers específicos para cada gen a estudiar, realizando duplicados de cada muestra y siguiendo el protocolo del proveedor, se realiza la Real-time PCR en el termociclador espectrofluorométrico.

Programa utilizado:

95°C – 5'	}	45 ciclos
95°C – 15"		
58°C – 30"		
72°C – 30"		

Una vez obtenidos los resultados y antes de proceder al análisis, todas las muestras se separan en geles de agarosa al 2% (w/v), se recuperan las

bandas y se secuencian (Servicio de Secuenciación de la Universitat Autònoma de Barcelona) para asegurar que los fragmentos amplificados son específicamente del gen que estábamos amplificando.

*Análisis de los datos obtenidos por el termociclador espectrofluorométrico:* el dato que se utiliza para analizar la cantidad de RNA presente en las muestras analizadas es el valor de Ct (*threshold cycle*) que representa el ciclo de la reacción de PCR en el cual la fluorescencia que detecta el termociclador supera un nivel umbral establecido previamente, igual en todas las muestras y experimentos. La fórmula utilizada para calcular los resultados es una ratio que compara el valor de la Ct de cada muestra con la media de los valores de Ct del grupo de animales control correspondiente y todo normalizado por los valores correspondiente al gen constitutivo utilizado (*housekeeping*, m36B4) (Pfaffl, 2001).

### **2.3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

En este trabajo se ha realizado extracción de proteínas totales de cultivos celulares establecidos y primarios, además de muestras de tejidos de diferentes áreas de SNP, ganglios de la raíz dorsal, nervios ciáticos y médulas.

#### **2.3.1. Extracción de proteínas**

*Reactivos:* buffer lisis RIA (50 mM Tris-HCl (pH 7,4) (Sigma), 150mM NaCl (Panreac), 1mM EDTA (USB), 1% NP-40 (Panreac) and 0,25% deoxicolato sódico (Fluka), tableta con inhibidores de proteínas (Roche), sonicador (Sonics).

*Procedimiento:* En el caso de los extractos celulares, éstos se resuspenden en 100µl de buffer RIA y se homogenizan mediante sonicación utilizando 2-4 pulsos de 10'' a 20A, manteniendo las células en hielo. En las muestras de tejidos se añade 200µl para ganglios y ciáticos, 400µl para médulas y las muestras se homogenizan utilizando unos 5-10 pulsos de 10'' a 30A, también manteniendo las células en hielo evitando que se calienten para

evitar posibles degradaciones proteicas. Una vez finalizada la homogenización en el caso de las muestras de tejidos, se centrifugan durante 15' a 12000g a 4°C para eliminar los restos de tejido, se recoge el sobrenadante y se guarda a -20°C hasta su cuantificación.

### **2.3.2. Cuantificación de proteínas**

Todos los extractos proteicos se cuantifican siguiendo el método colorimétrico BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce) que está basado en la capacidad quelante que tiene el ácido bicinconínico (BCA) con los iones Cu<sup>2+</sup> resultantes de la reducción del Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> por los enlaces peptídicos de las proteínas en solución alcalina, lo que se conoce como reacción de Biuret. El hecho que los iones Cu<sup>+</sup> sean quelados por cada 2 moléculas de BCA afavorece el viraje de la solución verdosa a lila que absorbe a 562nm y que se puede medir por espectrofotometría.

*Reactivos:* Protein Assay Kit (Pierce), Nanodrop (NanoDrop Technologies).

*Procedimiento:* Se parte de una recta patrón que consiste en diluciones seriadas desde un stock de albúmina bovina sérica (BSA) proporcionada en el kit, que está a 2mg/ml hasta 0,0625mg/ml. También se preparan las diluciones de las muestras proteicas a cuantificar (normalmente 1/10, pero puede variar si los valores no entran en la recta). Se prepara la solución *working reagent* tal y como indica el fabricante y se mezcla con 2µl de recta patrón o de nuestras muestras a cuantificar y se deja la reacción incubando 30' a 37°C. Posteriormente se mide la absorbancia a 562nm en el nanodrop, empezando por la recta patrón a partir de la cual se interpolan las medidas de absorbancia de las diferentes muestras, obteniendo las concentraciones para cada una de ellas.

### 2.3.3. Electroforesis desnaturante (SDS-PAGE)

La técnica de electroforesis SDS-PAGE se basa en la capacidad de movilización de las partículas con carga cuando se les aplica un campo eléctrico. La presencia de un detergente aniónico como es el caso del SDS, hace que las proteínas se desnaturalicen, se rompen los enlaces disulfuros y puedan migrar y separarse según su tamaño molecular.

*Reactivos:* Solución Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) (Amresco), tampón SDS-TrisHCl a pH 8,8 (1,5M Tris, 0,4% SDS), tampón SDS-TrisHCl a pH 6,8 (0,5M Tris, 0,4% SDS), APS 10% (Amresco), tetrametil-etilen-diamina (TEMED) (Sigma), tampón de carga 5X (20% glicerol (Panreac), 10% SDS (USB), 0,32% 2-mercaptoetanol (Sigma), 0,02% bromofenol blue (Sigma)), marcador de peso molecular (PageRuler Pre-Stained, (Fermentas)), cubeta Mini Protean Tetra Cell (BioRad), tampón de electroforesis 1X (25mM Tris (Sigma), 192mM glicina (Serva), 1% SDS (USB)).

*Procedimiento:* Se prepara un gel separador con concentración variable de acrilamida según el rango de peso molecular de las proteínas que se quieran detectar y un gel concentrador que está siempre a 3,9% de acrilamida que es la zona donde se cargarán las muestras. Para la polimerización se añade TEMED y APS. Según el grosor de los espaciadores de los cristales utilizados los geles pueden ser de 0,75mm o 1,5mm, pudiéndose cargar el doble de muestra en los segundos. Las muestras se preparan diluyendo la cantidad de  $\mu\text{g}$  que se desee correr con agua y con el tapón de carga 5X y se desnaturalizan a 98°C durante 10'. Posteriormente se cargan en el gel y se realiza la electroforesis a un voltaje inicial de 100V durante 20-25' para que las proteínas se concentren antes de entrar en el gel separador, y posteriormente durante 1h-1h15' a 150V según las bandas que se quieran detectar.

### 2.3.4. Electrotransferencia

*Reactivos:* Transblot semidry transfer cell (BioRad), membranas PVDF (GE Healthcare), metanol (Panreac), tampón de transferencia 1x (25mM Tris

(Sigma), 192mM Glicina (Serva)), papel Protean XL Size (BioRad), tampón Ponceau (5% en agua con ácido acético) (Sigma).

*Procedimiento:* Las proteínas presentes en el gen de acrilamida se transfieren a una membrana de PVDF que previamente se activa durante 10'' segundos en metanol, seguido de un lavado de 5' en agua destilada y 15' en tampón de transferencia. El gel de acrilamida con las proteínas también se equilibra durante 20' en tampón de transferencia igual que dos trozos de papel Protean. Se monta el sándwich de la transferencia que de abajo a arriba consta de papel, membrana, gel y otro papel eliminando con un rodillo las burbujas que puedan interferir durante el proceso. La transferencia se realiza durante 45' a 25V, y una vez finalizada se pueden visualizar las proteínas mediante tinción de 5' con Ponceau y lavando con agua destilada posteriormente para eliminar el exceso de solución, que posteriormente no influirá en la inmunodetección.

### **2.3.5. Inmunodetección**

*Reactivos:* TBS (50mM Tris (Sigma), 136mM NaCl (Panreac), 40mM KCl (Panreac), pH 7,5), leche en polvo (Central Lechera Asturiana), albúmina bovina sérica (BSA) (Sigma), Tween-20 (Sigma), anticuerpos primarios y secundarios, ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare), Hyperfilm ECL high performance chemiluminescence film (GE Healthcare), tampón de deshibridación (62,5mM Tris (Sigma), 100mM 2-mercaptoetanol (Sigma), 2% SDS (USB)).

#### **Anticuerpos primarios**

	<b>Organismo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>OctA-Probe (D-8)</b>	Conejo	1/300	Santa Cruz
<b>P-tirosina 4G10</b>	Ratón	1/1000	Upstate
<b>P0</b>	Conejo	1/500	Abcam
<b>Egr2</b>	Conejo	1/300	Santa Cruz
<b>P-Akt</b>	Conejo	1/500	Cell Signaling
<b>Akt total</b>	Conejo	1/500	Cell Signaling
<b>Actina</b>	Conejo	1/1000	Sigma

**Anticuerpos secundarios**

	Organismo	Dilución	Casa Comercial
Swine anti-rabbit HRP	Cerdo	1/3000	Dako
Rabbit anti-mouse HRP	Conejo	1/3000	Dako

**Tabla 6.** Anticuerpos utilizados en los western-blot.

*Procedimiento:* Una vez la membrana está transferida correctamente, se procede al bloqueo durante 1-2h a temperatura ambiente en una solución que evitará las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, que normalmente es 5% de leche en TBST (TBS con 0,1% de Twenn-20), para la inmunodetección de proteínas fosforiladas se usa la solución de bloqueo 5% de BSA en TBST. Posteriormente se incuba la membrana con 3-5ml de una dilución del anticuerpo en solución de bloqueo a la concentración que indica el fabricante (ver **Tabla 6**), O/N a 4°C excepto la actina que se incuba 1h a temperatura ambiente. Al día siguiente se realizan 3 lavados de la membrana de 10' con TBST y se incuba la membrana durante 1h a temperatura ambiente con la dilución del anticuerpo secundario (ver **Tabla 6**) que está conjugado con peroxidasa de rábano, en solución de bloqueo. Posteriormente se realizan 3 lavados de la membrana de 10' con TBST y se procede a la detección. Se mezclan los dos componentes del kit ECL Plus como indica el fabricante y se incuba la solución encima de la membrana durante 5' para que el luminol del kit reaccione con la peroxidasa y emita luz. Finalmente se exponen películas fotográficas con la membrana durante un determinado tiempo y se revelan automáticamente con una máquina que suministrará al film la sustancia reveladora, fijadora y finalmente agua destilada. Las bandas obtenidas en los films se escanean y densitometran con el programa GeneSnapSyngene y los resultados definitivos los obtenemos al normalizar los niveles obtenidos de las proteínas de interés por los de la actina. Si se tiene que inmunodetectar una proteína del mismo tamaño que una anterior hay que proceder a la deshibridación de los anticuerpos mediante incubación de la membrana durante 1h a 55°C con el tampón de deshibridación. Seguidamente habrá que volver a activar la membrana con metanol y a incubar la membrana con solución de bloqueo y ya se podrá proceder a la incubación con el siguiente anticuerpo primario, como se ha descrito anteriormente.

## **2.4. TÉCNICAS GENERALES DE CULTIVO CELULAR**

La manipulación de cultivos celulares se realizó en las instalaciones de nivel 2 de seguridad biológica de la Unidad de Producción de Vectores del CBATEG, para mantener al máximo las condiciones de asepsia y esterilidad.

*Equipamiento general:* Campana de flujo laminar vertical con sistema de luz ultravioletada (Telstar). Incubador de células (Forma Scientific), de atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>, 95% de humedad relativa y 37°C de temperatura). Congelador -80°C (Forma Scientific). Microscopio invertido (Nikon). *Material fungible:* pipetas de plástico estériles (ALP), placas de 10 y 15cm de diámetro, placas de 6, 24 y 96 pozos, tubos cónicos de 15 y de 50ml, criotubos, scrappers (Nunc).

### **2.4.1. Mantenimiento de cultivos celulares en monocapa**

*Reactivos: Medio de crecimiento: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (PAA), contiene 4,5 mg/mL glucosa y L-glutamina, se complementa con un 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (FBS) (PAA) y antibióticos penicilina/estreptomicina (P/S) 1x (100x) (PAA). Tampón fosfato salino (D-PBS): 137mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 (Panreac), Tripsina-EDTA (1x) (PAA).*

*Procedimiento:* El mantenimiento normalmente se realiza en placas de 15cm. Para los tipos celulares utilizados, se aspira el medio y se hace un lavado con 5ml de D-PBS. Se elimina el D-PBS y se añaden 3ml de tripsina y se deja actuar 3min a 37°C. Observamos que las células se han desenganchado completamente de la superficie de la placa y se añaden 5ml de medio de cultivo que inhibirá la acción de la tripsina. Con una pipeta procedemos a la disgregación mecánica hasta obtener una suspensión homogénea que se centrifuga durante 5' a 1000g, eliminamos el sobrenadante y el *pélllet* celular se resuspende en 5ml. Se siembra en cada placa de 15cm una dilución variable: una 1/4 si al día siguiente se quiere transfectar, 1/100 para el mantenimiento semanal. Se añaden 18ml de medio y se realizan

movimientos suaves para dispersar bien las células por toda la placa y se incuban a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.

#### **2.4.2. Criopreservación: congelación y descongelación de viales**

*Reactivos: Medio de congelación para RT4/S16/293QB-AAV-T:* FBS con un 10% de DMSO.

*Procedimiento de congelación:* Se tripsinizan las células y se centrifuga la resuspensión igual que en la realización del mantenimiento de células, se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 1ml de medio de congelación y se traspasa la suspensión a un criotubo de congelación. Rápidamente se ponen en el depósito de congelación gradual de células, que se deja a -80°C, así la temperatura va disminuyendo progresivamente. Pasadas 4h como mínimo ya podemos almacenar los criotubos.

*Procedimiento de descongelación:* Se descongela el vial de células en el baño a 37°C, rápidamente se pasa el contenido a un tubo cónico con 10ml de medio de cultivo. Se precipitan las células por centrifugación 5' a 1000g, eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el *pélllet* en 5ml de medio. Finalmente se siembran las células en la placa de 15cm. Cuando las células lleguen al porcentaje deseado de confluencia se realiza el protocolo de mantenimiento.

#### **2.4.3. Cultivos primarios de células de Schwann murinas**

*Reactivos: Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)* con o sin calcio/magnesio (PAA), medio de crecimiento: *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)* (PAA) con 10% de FBS (PAA) y 1% de P/S (PAA), DNAsa 1% (Sigma), Tripsina 1% (Sigma), colagenasa 2% y 1% (Sigma), polilisina D (Sigma), 0,01mM arabinosilcitolodina (AraC) (Sigma), 20µg/ml extracto de pituitaria (PEX) (Sigma), 0,5µM forskolina (Sigma).

*Procedimiento:* Los animales se eutanasiaron mediante dislocación cervical con unas pinzas. Seguidamente se sumergen en una solución de etanol 70% para desinfectar a los animales antes de empezar el cultivo. Se realiza la extracción de nervios ciáticos desde la rodilla hasta la región lumbar y se colocan en una solución de HBSS con calcio/magnesio. Una vez recopilados todos los nervios, se centrifugan durante 5' a 700g y se lava el *pélllet* con una solución de HBSS sin calcio/magnesio un par de veces para eliminar el resto de iones que podrían alterar la digestión enzimática. Para el cultivo de SC de rata, se va eliminando el epineurio de los nervios para evitar al máximo la contaminación del cultivo con fibroblastos. Seguidamente se incuban los nervios con colagenasa 2% durante 30' a 37°C y seguidamente con una mezcla de tripsina 1% y colagenasa 2% (1:1, v/v) durante 30' a 37°C. Para los cultivos de SC de ratón, los nervios son digeridos enzimáticamente con una mezcla de colagenasa 1%, tripsina 1% y DNAsa 1% (9:9:2, v/v) durante 30' a 37°C. Una vez finalizada la digestión enzimática se realiza digestión mecánica utilizando pipetas Pasteur y añadimos 10ml de medio de crecimiento para parar la acción de los enzimas. Se centrifugan las células a 700g durante 5', se resuspende el *pélllet* en medio de crecimiento y se plaquean en flascos de 25cm<sup>2</sup> previamente tratados con polilisina D durante al menos 4h, a razón de 2x10<sup>6</sup> células por flascón. Para eliminar los fibroblastos, a las 24h se le añade el antimetabólico AraC al medio durante 24-48h y posteriormente se reemplaza por medio de crecimiento con PEX y forskolina hasta que las células estén completamente confluentes. Los cultivos de SC de rata según el grado de contaminación por fibroblastos se pueden purificar también mediante incubación con anticuerpo Thy1 y complemento. Para los ensayos de funcionalidad de vectores virales, las células son cultivadas sin PEX ya que contiene NRG1typeIII.

#### **2.4.4. Cultivos primarios de neuronas sensoriales y cocultivos con células de Schwann**

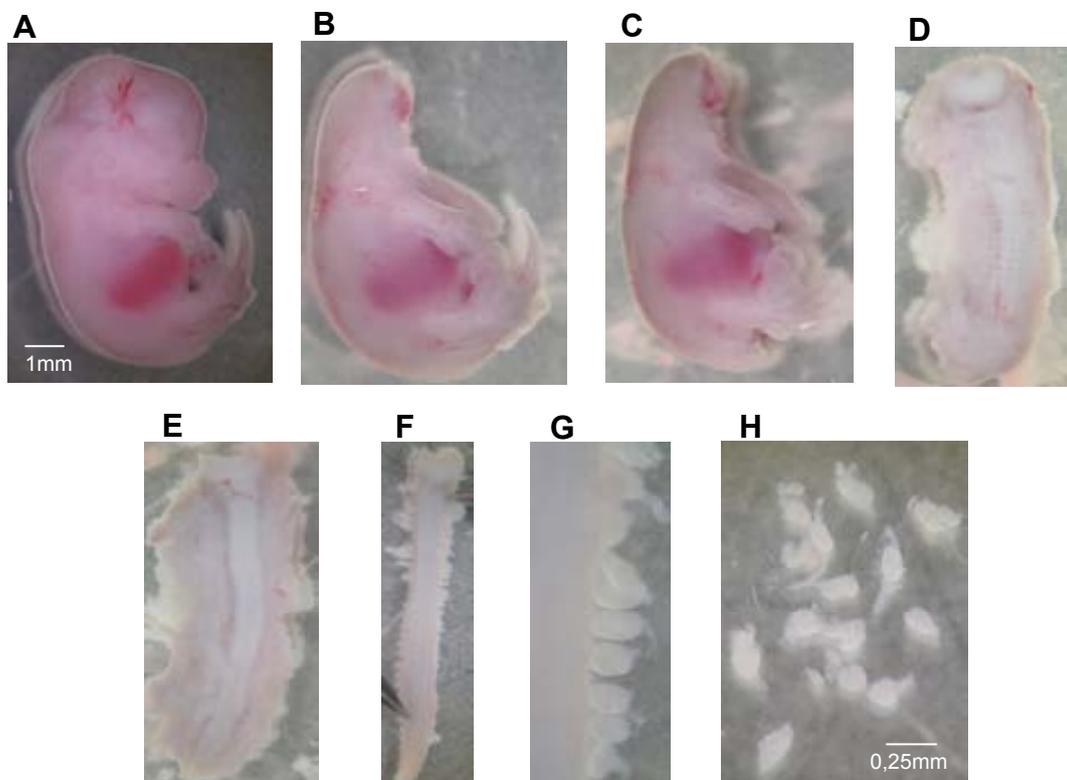
Para aprender esta tecnología se realizó una estancia de 3 meses gracias a una beca otorgada por la Generalitat, en el laboratorio del Dr. Gabriel

Corfas en el Children's Hospital de Boston, en la Universidad de Harvard, donde se adquirieron los conocimientos para realizar correctamente la disección y cultivo, además de los diferentes pasos para mielinizar los cocultivos.

*Reactivos:* Fluotane (Veterinaria Esteve), placas de Petri (Nunc), *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) sin Magnesio (PAA), tripsina 0,25% (Gibco), matrigel (BD Bioscience). *Medios utilizados:* Medio de crecimiento: *Modified Eagle's medium con Earle's Salts* (MEM) (PAA), 4g/l glucosa (Sigma), 50ng/ml factor de crecimiento nervioso (NGF), 2mM glutamina (Q) (PAA), 100U/ml penicilina/streptomycin (P/S) (PAA), 10% horse serum (HS) (PAA). Medio de purificación: MEM, 4g/L glucosa, 50ng/ml NGF, 1X suplemento N<sub>2</sub>, 2mM Q, 100U/ml P/S, 10μM uridina (Sigma), 10μM deoxiuridina (Sigma). Medio de diferenciación: 50% DMEM (PAA)-50% F12 Ham nutrientes (PAA), 50ng/ml NGF, 1X suplemento N<sub>2</sub>, 2mM Q, 100U/ml P/S. Medio de mielinización: MEM, 4g/L glucosa, 50ng/ml NGF, 1X suplemento N<sub>2</sub>, 2mM Q, 100U/ml P/S, 5% HS, 50μg/ml ácido ascórbico (Sigma), 20μg/ml extracto de pituitaria (PEX) (Sigma), 0,5μM forskolina (Sigma).

*Procedimiento:* Las ratonas embarazadas a E13,5 son eutanasiadas por inhalación de CO<sub>2</sub> o con fluotane (protocolo descrito posteriormente). Se realiza una incisión en la zona abdominal y se extraen los embriones que pondremos en una placa de Petri estéril. Con ayuda de unas tijeras pequeñas se van abriendo las bolsas embrionarias y se van sacando los embriones, situándolos en una placa de Petri con HBSS (**Figura 64A**). A continuación se van diseccionando los embriones hasta que sólo nos quedan las columnas vertebrales que se traspasarán a otra placa de Petri con HBSS (**Figura 64B-D**). Seguidamente se abre la columna vertebral, eliminando la parte ventral de las vértebras hasta que la médula espinal queda al descubierto, para finalmente separarla del resto de columna vertebral y ponerla en otra placa limpia con HBSS (**Figura 64E-F**). Si el procedimiento se ha realizado correctamente las médulas salen acompañadas con los ganglios de la raíz dorsal como si fuera un "rácimo de uvas" (**Figura 64F-G**). Finalmente los ganglios son separados de las médulas que serán descartadas (**Figura 64H**), y una vez acabada la

disección, éstos son emplazados en un tubo Falcon para su centrifugación a 1000g durante 5'. Los ganglios se someten a digestión enzimática, en HBSS con tripsina (10:1 v/v) durante 30' a 37°C, a continuación se para la acción del enzima añadiendo 10ml de medio de crecimiento para seguidamente centrifugar 5' a 1000g. Las células se resuspenden en medio de crecimiento fresco, se cuenta el total obtenido con una cámara de Neubauer y se siembran en las placas previamente tratadas con matrigel (250µl de matrigel en 9ml de HBSS) durante al menos 3h, según el uso experimental. En placas de 96w se siembran 15000 células, en placas de 24w con coverslips 60000 células, en placas de 12w 140000 células y en placas de 6w se siembran 250000 células.



**Figura 64.** Fotos de los principales pasos para la obtención de los cultivos de neuronas sensoriales. **A)** Embrion E13,5, **B-D)** Disección hasta obtener las columnas vertebrales, **E)** Columna vertebral sin la parte ventral, dejando ver la médula espinal, **F-G)** Médula espinal con todos los ganglios de la raíz dorsal, **H)** Ganglios de la raíz dorsal una vez separados de la médula espinal. Tienen la misma escala **A-F)** y **G-H)**.

Para los experimentos donde se han utilizado neuronas purificadas, durante 2 semanas, se van alternando los cambios de medio, entre medio de

crecimiento y medio de purificación hasta que se eliminan todas las células gliales y fibroblastos.

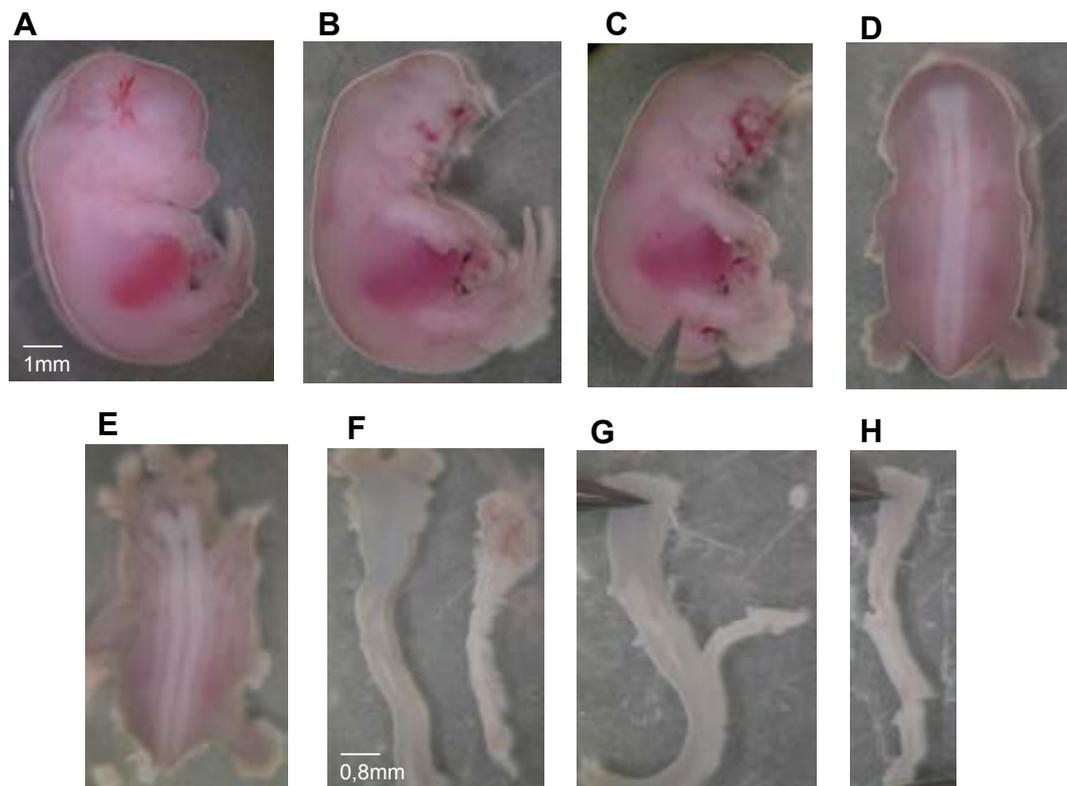
Para los experimentos de mielinización, las células se cultivan con medio de crecimiento hasta que las células gliales están confluentes y están formando una alfombra debajo de las neuronas. Seguidamente se sustituye el medio de crecimiento por medio de diferenciación durante 2-4 días y finalmente se mantienen en medio de mielinización hasta que las células gliales mielinizan los axones de las neuronas. Para los experimentos de real-time PCR y extracción de proteínas (protocolos descritos anteriormente), se han mantenido mielinizando durante un mes y dos meses para estudiar la formación de mielina detectada por inmunocitoquímica con MBP (protocolo descrito posteriormente).

#### **2.4.5. Cultivos primarios de neuronas motoras**

*Reactivos:* Fluotane (Veterinaria Esteve), placas de Petri (Nunc), *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) sin Magnesio (PAA), medio L-15 (Gibco), tripsina 0.25% (Gibco), BSA 4% (Sigma), DNAsa 1mg/ml (Sigma), laminina 3µg/ml (Sigma), poliornitina 15µg/ml (Sigma). *Medios utilizados:* Medio de crecimiento: *Neurobasal Medium* (Gibco), 0,5mM glutamina (PAA), 100U/ml penicilina/streptomycin (P/S) (PAA), 2% suero de caballo (HS) (PAA), 1X suplemento B27 (Gibco), 25µM mercaptoetanol (Sigma), 10ng/ml CNTF (Preprotech), 100pg/ml GDNF (Preprotech).

*Procedimiento:* Para el cultivo primario de neuronas motoras igual que para las sensoriales también se utilizan embriones (E13,5) (**Figura 65A**). La disección hasta conseguir las médulas espinales se realiza por la parte ventral del animal y es muy importante dejar parte del cerebelo para una mejor obtención posteriormente de las médulas (**Figura 65B-E**). En este punto se estira de la aracnoides que está recubriendo la médula de manera que quedan completamente desplegadas y sin ganglios (**Figura 65F**). Seguidamente se eliminan las partes laterales que corresponden a la parte dorsal de la médula donde está el componente sensorial (**Figura 65G-H**). Las médulas espinales se disgregan en trocitos y se someten a digestión enzimática con tripsina en

HBSS (1:10v/v) durante 10' a 37°C. A continuación se transfieren los fragmentos medulares en un tubo con L-15, BSA 4%, DNAsa 1mg/ml (8:1:1v/v) y se disgregan mediante digestión mecánica, se incuba 2' a temperatura ambiente y se recupera el sobrenadante. Seguidamente se añaden 1,5ml de BSA 4% y se centrifugan las células durante 5' a 400g, se elimina el sobrenadante y se resuspende el *pélllet* en medio de crecimiento. Igual que para las neuronas sensoriales se recuenta el número mediante la utilización de una cámara de Neubauer y se siembran a la misma confluencia que las neuronas sensoriales según los pocillos a utilizar. Anteriormente a la siembra las placas tienen que haber sido tratadas con poliornitina y posteriormente con laminina al menos durante 3h antes. Se mantiene el cultivo cambiando el medio por medio de crecimiento fresco cada dos días y cuando está la capa glial completamente formada y confluyente se realizan los experimentos con las diferentes concentraciones de glucosa.



**Figura 65.** Fotos de los principales pasos para la obtención de cultivos de neuronas motoras. **A)** Embrión E13,5, **B-F)** Disección hasta obtener las médulas espinales, **G-H)** Disección de las médulas espinales hasta obtener la parte con las neuronas motoras. Tienen la misma escala **A-E)** y **F-H)**.

#### 2.4.6. Introducción de DNA plasmídico en células por transfección

*Reactivos:* Polietilenimina (PEI) 10mM (PolyScience), NaCl 0,9% (BBraun). *Medio de transfección:* medio DMEM (PAA) sin FBS ni antibióticos.

*Procedimiento:* El día antes de la transfección se siembran las células para que el día siguiente estén a una confluencia del 70%. Normalmente se preparan placas de 6 pozos y se realiza cada condición por triplicado. Se transfectan 3µg de plásmido por pozo, se disuelve el DNA en 200µl de NaCl 150mM. En un tubo aparte se disuelven 2,25µl de PEI 10mM por cada µg de DNA con NaCl 150mM, en un volumen final igual que la dilución del DNA. Se añade poco a poco la dilución del PEI a la dilución del DNA y se incuba durante 20' a temperatura ambiente para que se formen los complejos PEI-DNA, posteriormente se aspira el medio de cada pozo, se le añade el medio de transfección y el volumen de DNA/PEI correspondiente a cada pozo hasta tener 750µl/pozo. Se incuban las placas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 3 horas, finalmente se aspira el medio y se añaden 2ml de medio fresco por pozo complementado con 10% de FBS y 1% de P/S. Se incuban a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> las horas necesarias según el experimento.

#### 2.4.7. Experimentos *in vitro* con diferentes concentraciones de glucosa

*Reactivos:* Los medios utilizados fueron exactamente los mismos que para hacer el crecimiento de cada cultivo celular, modificando la cantidad de glucosa y la concentración de FBS.

*Procedimiento:* Se hicieron dos tipos de experimentos, con o sin privación de alta glucosa (*starving*). En los experimentos con *starving*, las células fueron incubadas con medio con 5,5mM de glucosa y sin FBS durante 16h y luego el medio fue reemplazado por las mismas condiciones y por diferentes concentraciones crecientes de glucosa y con 1% o 10% de FBS. Para los experimentos sin *starving*, simplemente se mantuvo la concentración utilizada en condiciones normales (25mM) y se les subió la concentración de

glucosa 20mM, es decir hasta 45mM. En el caso de experimentos para estudio de expresión mediante real-time PCR se mantuvieron las condiciones 24h y para proteínas se hicieron experimentos a 24h y 48h postinducción con las diferentes concentraciones de glucosa. En el experimento de expresión de GFP bajo el promotor de P0, se realizó *starving* 24h después de la transfección y se analizó la expresión de GFP 48h después de los cambios de medio.

#### **2.4.8. Análisis de la expresión de GFP por citometría de flujo**

*Reactivos:* *scrappers* (Nunc), D-PBS, citómetro de flujo.

*Procedimiento:* Las células se recuperan utilizando *scrappers* en D-PBS, posteriormente se analizan por un citómetro de flujo que detecta el porcentaje de células positivas para GFP en cada condición.

#### **2.4.9. Infección de células con vectores virales**

*Reactivos:* *Medio de infección:* DMEM con 2% de FBS, *scrappers* (Nunc).

*Procedimiento:* El día anterior a la infección se siembran las células en placas de 6 pozos para que al día siguiente estén a una confluencia del 80%. Se procede a aspirar el medio y se ponen 600µl de medio de infección y el correspondiente volumen de virus según las partículas físicas a la que se quiere infectar (PP/celula). A las 48h se recuperan las células con *scrappers*, se centrifugan y se guardan los *péllets* para hacer la extracción de proteínas.

#### **2.4.10. Ensayos de funcionalidad de los vectores virales**

*Procedimiento:* Se infectan 293-QB con los diferentes vectores virales, adenoasociados y lentivirales según el protocolo descrito anteriormente y 48h después se recuperan y se incuban con SC primarias de rata durante 30'. Posteriormente se recogen todas las células y se guardan los *péllets* para la

extracción de proteínas. En el caso del análisis por real-time PCR, los cocultivos se mantuvieron durante 24h.

#### 2.4.11. Inmunocitoquímica en cultivos celulares

*Reactivos:* PFA 4% (Sigma), PBS, metanol (Panreac), Tris 0,05M (Sigma), Tris 0,05M + 0,05% tween-20 (Sigma), Tris 0,05M + 0,05% tween-20 + 0,2% BSA (Sigma), anticuerpos primarios y secundarios, medio de montaje (Sigma).

##### Anticuerpos primarios

	Organismo	Dilución	Casa comercial
OctA-Probe (D-8)	Conejo	1/100	Santa Cruz
MBP	Ratón	1/500	Covance

##### Anticuerpos secundarios

	Organismo	Dilución	Casa Comercial
Goat anti-rabbit 488	Cabra	1/200	Molecular Probes
Goat anti-mouse 568	Cabra	1/500	Molecular Probes

**Tabla 7.** Anticuerpos utilizados en las inmunocitoquímicas

*Procedimiento:* Las células se lavan con PBS para eliminar los restos de medio y posibles células muertas antes de fijarlas con PFA 4% durante 15-30' a temperatura ambiente. Posteriormente se repiten dos lavados con PBS y también se fijan con metanol frío durante 15-30' a temperatura ambiente. Seguidamente se lavan dos veces más con PBS y en este paso se pueden guardar a 4°C hasta realizar la inmunocitoquímica. Se realiza una fijación doble, ya que hay anticuerpos que no funcionan sólo con fijación con metanol y por el contrario los hay que la necesitan. Se inicia el protocolo con un lavado con Tris 0,05M, seguido por dos lavados con Tris 0,05M + 0,05% tween-20 de 10' cada uno. A continuación se incuba 2h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo, Tris 0,05M + 0,05% tween-20 + 0,2% BSA. Después se procede a la incubación O/N a 4°C con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (ver **Tabla 7**). Posteriormente se realizan 3 lavados de 10'

con Tris 0,05M + 0,05% tween-20 y se incuba con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo (ver **Tabla 7**) durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente se realizan 3 lavados con Tris 0,05M + 0,05% tween-20 y un lavado con Tris 0,05M de 10' cada uno y se montan las muestras con solución de montaje en el caso de los coverslips o se miran directamente al microscopio en el caso de tener las células en placas de 96w.

## **2.5. PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES**

El trabajo con vectores adenoasociados y lentivirales se realiza en condiciones de bioseguridad de nivel 2 siguiendo el Reglamento de Seguridad de la Unidad de Producción de Vectores del CBATEG. Todos los residuos generados son eliminados según los procedimientos correspondientes al nivel 2 de bioseguridad.

### **2.5.1. Generación y purificación de vectores adenoasociados**

El método utilizado para la producción de AAV se basa en el protocolo de una triple transfección que permite la obtención de preparaciones libres de adenovirus contaminantes. Cada plásmido tiene una función específica en el proceso de la producción: pRep2Cap1/pRep2Cap9 codifica para las proteínas necesarias para la replicación viral y aporta las proteínas de la cápside, pXX6 aporta los genes adenovirales necesarios para la replicación del AAV y por último un plásmido que contiene el cassette de expresión flanqueado por las ITRs virales que contienen la señal de empaquetamiento del virus. Para la producción de los vectores pseudotipados se mantienen las ITRs del AAV2 y el gen Rep y se cambia el gen Cap2 por los genes Cap de los otros serotipos, cambiando así el tropismo de los vectores (McCarty *et al.*, 2004).

*Reactivos y materiales:* plásmidos pXX6, pRep2Cap1, pRep2Cap9, pAAV-CAG-PLK-WPRE, pAAV-CAG-PLK-GFP-WPRE, pGG2-NRG1typeIIIECD/FL-WPRE, pGG2-NRG1typeIIIECD/FL-WPRE y pGG2-NRG1typeIECD/FL-WPRE, PEI (PolyScience), benzonasa (Novagen), PBSMK (PBS 1X, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM KCl), iodixanol (Axis-Shield PoC AS), phenol red

(Sigma), polietilenglicol (PEG) (Fluka), tampón de lisis (50mM Tris (Sigma), 20mM NaCl (Panreac), 2mM MgCl<sub>2</sub> (Panreac)).

*Procedimiento:* Se preparan 20 placas de 15cm de células 293-AAV para que estén a una confluencia del 70% el día de la transfección. Se realiza la triple transfección con PEI de las 20 placas utilizando 500µg de pXX6, 250µg de pRep2Cap1/pRep2Cap8 y 250µg del plásmido con el transgén flanqueado por las ITRs virales, que se mezclarán con DMEM y se repartirán en cada placa hasta que quede un volumen final de 14ml por placa. Transcurridas 6h se cambia el medio. Cuarenta y ocho horas postransfección se recogen las células con ayuda de un *scraper*, se centrifugan las células, se resuspenden en tampón de lisis y se lisan mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Se precipitan los restos celulares por centrifugación de 10' a 2000g, se recupera el sobrenadante, se añade la benzonasa (50U/ml) para degradar el DNA celular y se incuba 1h a 37°C. Posteriormente se centrifugan 20' a 3000g. Al sobrenadante se le añade PEG a razón de 1ml/4ml de lisado para facilitar la precipitación de las partículas virales, se deja actuar 3h a 4°C. Seguidamente se centrifuga durante 15' a 8000g a 4°C, se decanta el sobrenadante y se añaden 15ml de Lysis Buffer por gradiente que se realizará, se deja 48h a 4°C. Después se prepara el gradiente de iodixanol, añadiendo en el fondo y lentamente las soluciones empezando por la menos densa y atravesando las capas anteriormente depositadas: primero se añaden los 15ml del lisado, después 9ml de iodixanol al 15% con NaCl 1M en PBSMK, seguidamente 6ml de iodixanol al 25% en PBSMK con phenol red para que quede rojo, después 5ml de iodixanol al 40% en PBSMK y finalmente 5ml de iodixanol al 60% en PBSMK y phenol red para que quede amarillo. Se enrasan y se equilibran con PBSMK los tubos y se sellan, se centrifugan a 69000g durante 1h. Con una aguja y una jeringa se van recogiendo fracciones de la fase de iodixanol al 40% perforando el tubo que luego serán tituladas según el procedimiento explicado a continuación.

\*El método de purificación utilizado basado en el fraccionamiento del lisado crudo mediante un gradiente de densidad en un medio no iónico como el iodixanol, tiene la ventaja respecto a la purificación clásica con doble gradiente

con cloruro de cesio que las partículas no agregan y que el iodixanol es inerte y por tanto no requiere purificación posterior, acortando el proceso (Zolotukhin *et al.*, 1999).

### **2.5.2. Determinación del título de los vectores adenoasociados**

La determinación del título de las preparaciones virales se realiza mediante la utilización de una molécula llamada *picogreen* que se intercala en las cadenas dsDNA, cuantificando el número de genomas virales presentes en la preparación.

*Reactivos:* Tampón de lisis (20mM Tris pH 7,4 (Sigma), 200mM NaCl (Panreac)), 0,2% SDS (USB), termociclador de PCR (Eppendorf), placa 96w de plástico negra (Nunc), fluorímetro (Wallac 1420 Victor<sup>3</sup> TM) del Servicio de Análisis y Fotodocumentación del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universitat Autònoma de Barcelona, *picogreen* (Invitrogen).

*Procedimiento:* Se enrasan 2µl de cada muestra a cuantificar hasta un volumen final de 10µl, seguidamente se le añaden 10µl del tampón de lisis. Se procede a la lisis de las cápsides virales en el termociclador, realizando un calentamiento de 1h a 70°C seguida de enfriamientos de 5°C cada minuto. Una vez finalizado el programa del termociclador, se cogen los 20µl de cada tubo y se añade cada muestra a cada pocillo de la placa de 96w. Se le añaden 180µl del *picogreen* a cada pocillo, se incuban 5' a temperatura ambiente y se procede a la lectura de la fluorescencia de la placa con un fluorímetro. Además de las muestras analizadas se realiza una recta patrón en la que se lee la fluorescencia de 40ng, 13,33ng, 4,44ng, 1,48ng, 0,49ng, 0,16ng, 0,12ng y 0ng, y muestras sin tampón de lisis que detectan el DNA exógeno presente, que se restará de los valores obtenidos. Interpolando la fluorescencia obtenida de las muestras con la de la recta patrón se obtienen los ng de DNA presentes en cada muestra y con la siguiente fórmula se calculan los genomas virales de cada preparación:

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

A son los ng/ml de DNA: ng/ml = ng en pozo x 1000 / C

B es la longitud del genoma del AAV (distancia en bases entre las ITR)

C es el número de  $\mu$ l leídos

### 2.5.3. Generación y concentración de vectores lentivirales

El método utilizado para la producción de LV se basa en una triple transfección. Cada plásmido tiene una función específica en el proceso de la producción, psPAX2 codifica para las proteínas gag y pol necesarias para la replicación viral y aporta las proteínas de la cápside, pMD2G codifica para la proteína VSV necesaria para la envoltura proteica del lentivirus y por último un plásmido que contiene el cassette de expresión flanqueado por las LTRs virales (Naldini *et al.*, 1996).

*Reactivos:* plásmidos psPAX2, pMD2G, pWPT-GFP, pWPT-NRG1typeIIIECD/FL, pWPT-NRG1typeIECD/FL y pWPT-NRG1typeIECD/FL, jeringas de 50ml (BBraun), filtros de 45 $\mu$ m (Millipore).

*Procedimiento:* Se preparan 3 placas de 293T para que estén a confluencia del 70% el día de la transfección. Se realiza la triple transfección con PEI de las 3 placas utilizando 15 $\mu$ g de psPAX2, 45 $\mu$ g de pMD2G y 60 $\mu$ g del plásmido con el transgén, que se mezclarán con DMEM y se repartirán en cada placa hasta que quede un volumen final de 14ml por placa, transcurridas 4h se cambia el medio. A las 36h, 48h, 60h, 72h y 84h postransfección se recoge el sobredante de las células eliminando los restos celulares mediante filtros de 45 $\mu$ m y se guarda a -80°C. Una vez recogidos todos los sobrenadantes el virus se concentra mediante centrifugación de 2h a 50000g a 4°C. Se resuspenden los *péllets* con 100 $\mu$ l de DMEM que se deja O/N a 4°C, para posteriormente alicuotar el virus y guardarlo a -80°C.

#### **2.5.4. Determinación del título de los vectores lentivirales**

La determinación del título de las preparaciones lentivirales se realiza mediante diluciones seriadas del virus infectando células 293T (protocolo descrito anteriormente) y posteriormente se cuantifican los clones GFP positivas bajo microscopia de fluorescencia, 48h después de la infección.

### **2.6. TÉCNICAS GENERALES UTILIZADAS *IN VIVO***

#### **2.6.1. Inducción de la diabetes**

La inducción de la diabetes experimental en los ratones se hizo mediante la utilización del tóxico llamado estreptozotocina (STZ), análogo de la glucosa. Los ratones ICR adultos fueron inyectados intraperitonealmente durante cinco días consecutivos con una dosis de 45mg/kg. Los animales para estudios de expresión de genes en SNP por real-time fueron sacrificados a día 3, día 5, una semana, ocho semanas y 16 semanas después de finalizar el tratamiento con STZ. A los animales que tenían que ser inyectados con los vectores virales se les indujo la diabetes experimental, cuatro semanas después se les inyectó intratecalmente (protocolo descrito posteriormente) el vector viral y 24 días y 31 días más tarde se procedió al análisis electrofisiológico (protocolo descrito posteriormente) y a la eutanasia de los animales.

Las crías ICR fueron inyectadas a P2, P3 y P7 con la misma dosis que los adultos y fueron sacrificados a P18.

El SER-CBATEG periódicamente determinaba el peso y las glucemias de los animales diabéticos.

#### **2.6.2. Inyección intratecal en ratones**

El proceso de inyección *in vivo* de los diferentes vectores se realizó en el estabulario SPF del CBATEG. Los ratones fueron manipulados según las

normas de bienestar animal, evitando el mayor estrés para los animales y siguiendo un protocolo aceptado por el Comité de Ética de la Universitat Autònoma de Barcelona.

La inyección intratecal, nos permite introducir nuestros vectores virales en el líquido cefalorraquídeo de los ratones de manera que pueda difundir por todo el sistema nervioso.

*Reactivos:* ketamina/xilacina (100/10mg/kg) (Bayer), solución salina (BBraun), hojas de bisturí (BBraun), jeringa de 33G (Hamilton), hilo de sutura de 5/0 (BBraun), grapas estériles (FST), solución yodada (BBraun).

*Procedimiento:* Inicialmente los animales son anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina, y se les aplica solución salina en los ojos para evitar la sequedad de la córnea. A continuación se afeita toda la parte dorsal del animal, desde la región cervical hasta la pelvis, que es la zona donde hay que realizar la operación y se desinfecta con etanol. Con el bisturí se realiza una incisión en la dermis desde la región torácica hasta la lumbar y se separa la musculatura que rodea las vértebras lumbares hasta la visualización de éstas. La inyección se realiza manualmente en la región lumbar entre las vértebras L3 y L4 mediante una jeringa Hamilton. Para la infusión del virus en el líquido cefalorraquídeo, se introduce la jeringa unos milímetros en la región intervertebral realizando una pequeña presión para poder perforar la aracnoides. El virus se inyecta muy lentamente y se espera 1' antes de retirar la jeringa para evitar el eflujo del virus. Finalmente se sutura la musculatura y se cierra la dermis con grapas estériles. La zona operada es desinfectada con solución yodada.

### **2.6.3. Análisis electrofisiológicos**

Los estudios de conducción nerviosa se realizan en el nervio ciático de forma bilateral a día 24 y 31 postinyección intratecal, en colaboración con el grupo del Dr. Xavier Navarro del Departamento de Fisiología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

*Reactivos:* Pentobarbital (40mg/kg), osciloscopio (Tektronik 420).

*Procedimiento:* Los animales son anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital y se estimula el nervio por vía percutánea mediante un par de electrodos de aguja pequeña y midiendo todos los potenciales de acción evocados con un osciloscopio Tektronik 420), tal como está descrito en (Verdu *et al.*, 1999), (Navarro *et al.*, 1994). Así, se registraron los potenciales de acción muscular compuesta (CMAP), la conducción ortodrómica (onda M), el arco de reflejo monosináptico (onda H), en el músculo plantar y tibial anterior. De la misma manera, se registraron los potenciales de acción compuesta en nervio sensorial (CNAP) con electrodos colocados en el cuarto dedo del pie, cerca de los nervios digitales. La velocidad de conducción nerviosa (NCV) se calculó para cada segmento. Durante todas las pruebas electrofisiológicas los animales fueron colocados en una placa controlada por una bomba de circulación de agua caliente, manteniendo la temperatura de la piel por encima de los 32°C.

#### **2.6.4. Eutanasia**

Según el uso que se le vayan a dar a las muestras de los ratones se utilizará una técnica u otra. Para obtención de muestras para extracción de RNAs o proteínas, o para cultivos *ex vivo* de tejidos, la técnica utilizada principalmente es la decapitación ya que permite una rápida eliminación de la sangre que pueda interferir en el procesamiento posterior de las muestras. Si las muestras de los animales tienen que utilizarse posteriormente para inmunohistoquímica o estudios morfométricos se perfunden los animales con paraformaldehído 4% mediante perfusión intracardíaca.

*Reactivos para eutanasia por decapitación:* Fluotane (Veterinaria Esteve).

*Procedimiento:* Los ratones son anestesiados con Fluotane y posteriormente son decapitados para eliminar toda la sangre posible.

Rápidamente se procede a la extracción de las muestras de interés (nervio ciático, ganglios de la raíz dorsal, médula) y se congelan con nitrógeno líquido para evitar la degradación en el caso de que su uso sea para extracción de RNAs o proteínas. Para cultivos *ex vivo* de ganglios de la raíz dorsal, las muestras no se congelan sino que se cultivan directamente (protocolo descrito posteriormente).

*Reactivos para eutanasia por perfusión:* ketamina/xilacina (100/10mg por kg de peso) (Bayer), aguja con palomilla de 27G (BBraun), tampón fosfato 0,1M (para 100ml: 0,29g de ácido monofosfato (Fluka), 2,17g de ácido difosfato (Fluka)), paraformaldehido 4% (PFA) (en tampón fosfato 0,1M) (Sigma).

*Procedimiento:* Se anestesia el ratón mediante inyección intraperitoneal con ketamina/xilacina. Cuando el ratón está profundamente dormido, se realiza un corte a nivel abdominal, perforando la dermis, los músculos abdominales y el diafragma, hasta dejar al descubierto el corazón. Se realizan unos cortes en el hígado para permitir la salida del líquido de perfusión. A continuación se introduce la aguja con la palomilla en el corazón, en el ventrículo izquierdo. Primero se elimina toda la sangre del tejido, inyectando unos 5ml de tampón fosfato y posteriormente se inyecta lentamente el PFA frío, unos 20ml por animal, hasta una correcta fijación de los tejidos. Después se procede a la extracción de los tejidos de interés (nervios tibiales y ciáticos, ganglios de la raíz dorsal y médulas espinales) que serán sumergidos en PFA 4% O/N a 4°C para asegurar una completa fijación, a continuación se realizan lavados con tampón fosfato para posteriormente procesarlas según las inclusiones que se quieran realizar, dependiendo de los anticuerpos a utilizar en las inmunohistoquímicas, OCT o parafina. En el caso de los nervios tibiales estos serán procesados mediante inclusión Spurr para poder realizar cortes semifinos para su posterior análisis morfométrico.

#### **2.6.5. Preparación y obtención de secciones de organotípicos**

*Reactivos:* *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) con calcio/magnesio (PAA), placas de 48w (Nunc), medio de cultivo organotípico (DMEM-F12 (PAA),

10% suero de caballo (PAA), 1% penicilina/estreptomicina (PAA), 1% gentamicina (PAA)), PFA 4% (Sigma), tampón fosfato 0,1M (para 100ml: 0,29g de ácido monofosfato (Fluka), 2,17g de ácido difosfato (Fluka)), vibratomo (Zeiss).

*Procedimiento:* Una vez eutanasiado el animal los ganglios de la raíz extraídos en fresco se colocan en una placa que contiene medio HBSS con  $\text{Ca}^+$  y  $\text{Mg}^+$ , y una vez finalizada la extracción se colocan en placas de 48w y se cultivan durante 24 horas con el medio específico para cultivos organotípicos, a razón de 2-3 ganglios por pozo. Posteriormente se infectan con el vector viral correspondiente y, transcurridos 7-8 días, las muestras se fijan con PFA 4% a 4°C y O/N. A continuación las muestras se lavan con tampón fosfato para eliminar el exceso de solución fijadora y se realiza la inclusión de las muestras en agarosa 6%. Se realizan secciones de 100-150µm de las muestras con un vibratomo, que se recogen y se mantienen en PBS a 4°C hasta realizar la inmunodetección, en placas de 48w.

### **2.6.6. Inclusión y obtención de secciones en criostato**

*Reactivos:* Sacarosa 30% (Sigma), moldes de plástico (Cryomold Biopsy), OCT (Tissue Tek), isopentano (Panreac), criostato (Shandon), portas (Thermo Scientific), silane (5ml de 3-trimethoxysilyl propyl metacrylate (Sigma) y 245ml de acetona (Panreac)).

*Procedimiento:* Los tejidos fijados se crioprotegen sumergiéndolos en sacarosa 30%, solución donde al inicio las muestras inicialmente flotan, durante 24-48h a 4°C. La solución se va cambiando 2-3 veces hasta que los tejidos ya no flotan. A continuación se disponen las muestras en los moldes de plástico y se cubren los tejidos con medio de congelación OCT. Para proceder a la congelación de las muestras, se coloca isopentano en un recipiente que sumergiremos en nitrógeno líquido. Los moldes con la muestra y el OCT, se van sumergiendo lentamente en el isopentano frío, hasta que quedan completamente congeladas. Los bloques se pueden guardar a -20°C hasta su procesamiento en el criostato. Los cortes que se obtienen del criostato, que son

de 12µm para las muestras de nervios ciáticos y ganglios y de 20µm para médula espinal, son pescados en portas tratados previamente en silane durante 1', seguidamente lavados dos veces con D-PBS y secados O/N a 55°C. Los portas con las secciones se pueden guardar a -20°C hasta realizar la inmunohistoquímica.

### **2.6.7. Inclusión y obtención de secciones en microtomo**

*Reactivos:* etanol 70-80-96-100% (Panreac), xilol (Panreac), parafina, dosificador de parafina líquida, moldes de plástico (Tespa), portas (Thermo Scientific), microtomo (Leica).

*Procedimiento:* Los tejidos fijados, se someten a varios lavados con agua destilada para eliminar el exceso de PFA 4%. A continuación se procede a la deshidratación sumergiéndolos en concentraciones crecientes de etanol, 30' en etanol 70%, 30' en etanol 80%, dos lavados de 10' en etanol 96% y 3 lavados de 10' en etanol 100%. A continuación se sumergen en xilol, dos veces durante 5' en xilol I y luego 10' en xilol II hasta que el tejido adquiere la dureza adecuada y se procede a la inclusión en parafina. El tejido se sumerge en parafina líquida reciclada a 65°C durante 30'-1h y después en parafina líquida limpia O/N. Durante la deshidratación e inclusión, se utilizan moldes de plástico donde se introducen las muestras. Para hacer los bloques, se utilizan los moldes y un dosificador de parafina líquida para rellenar los bloques de parafina y una placa calefactora a 60°C para evitar que la parafina se solidifique antes de la correcta colocación de las muestras. Una vez realizados los bloques estos se dejan enfriar en una placa a 4°C y por último se desmontan de los moldes, conservándolos hasta su utilización a temperatura ambiente. Las secciones de parafina obtenidas mediante un microtomo de rotación manual, son entre 3-7µm. Los bloques de parafina se mantienen fríos entre 0 y -10°C unos minutos antes de su procesamiento para evitar que el tejido se dilate, y posteriormente se obtienen las secciones que se estiran en un baño a 42°C para finalmente ser pescadas con portas. Se pueden guardar a temperatura ambiente hasta su utilización para inmunohistoquímica.

### **2.6.8. Inclusión y obtención de cortes semifinos de nervios tibiales**

Las inclusiones y la obtención de los cortes semifinos son realizadas por el servicio de Morfología del CBATEG.

*Reactivos:* Paraformaldehído (PFA) (Sigma), Glutaraldehído (GLU) (Panreac), tampón fosfato 0,1M (para 100ml: 0,29g de ácido monofosfato (Fluka), 2,17g de ácido difosfato (Fluka)), tetraóxido de osmio (Sigma), acetona (Panreac), resina epoxy (Sigma), ultramicrotomo (Leica).

*Procedimiento:* Los nervios tibiales se fijan durante 1h en una solución de PFA 2%-GLU 2.5%. Posteriormente se realizan 3 lavados de 10' con tampón fosfato antes de proceder a la postfijación con tetraóxido de osmio 1% durante 1h a 4°C. A continuación se realizan deshidrataciones, sometiendo a las muestras a concentraciones crecientes de acetona, incubando 15 min en acetona 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%. Finalmente se procede a la infiltración con la resina epoxy (Spurr), incubando las muestras con resina:acetona 100% 1:3 (v/v) durante 2h, resina:acetona 100% 2:2 (v/v) durante 3h, resina:acetona 100% 3:1 (v/v) durante 5h. Posteriormente ya con resina pura se incuban las muestras durante 2h, posteriormente O/N, seguido de 2h más hasta que se confeccionan los bloques dejando polimerizar la resina a 60°C durante 48h. Una vez polimerizados los bloques, se realizan secciones con un ultramicrotomo de 0,5µm. Los cortes se tiñen con azul de toluidina, que se unirá a las regiones densas de la mielina de los axones y nos permitirá hacer el análisis morfométrico (protocolo descrito posteriormente).

### **2.6.9. Inmunohistoquímica de cortes de cultivos organotípicos**

*Reactivos:* Tris 0,05M (Sigma), Tris 0,05M + 1,5% Tween-20 (Sigma), Tris 0,05M + 1,5% tween-20 + 0,2% BSA (Sigma), anticuerpos primarios y secundarios, solución de montaje (Sigma).

**Anticuerpos primarios**

	Organismo	Dilución	Casa comercial
OctA-Probe (D-8)	Conejo	1/100	Santa Cruz
NeuN	Ratón	1/100	Chemicon

**Anticuerpos secundarios**

	Organismo	Dilución	Casa Comercial
Goat anti-rabbit 488	Cabra	1/200	Molecular Probes
Goat anti-mouse 568	Cabra	1/500	Molecular Probes

**Tabla 8.** Anticuerpos utilizados en las inmunohistoquímicas

*Procedimiento:* Se inicia la inmunohistoquímica con un lavado con Tris 0,05M, seguido por dos lavados con Tris 0,05M + 1,5% tween-20 de 10' cada uno. A continuación se incuba 2h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo, Tris 0,05M + 1,5% tween-20 + 0,2% BSA. Después se procede a la incubación O/N a 4°C con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (ver **Tabla 8**). Posteriormente se realizan 3 lavados de 10' con Tris 0,05M + 1,5% tween-20 y se incuba con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo (ver **Tabla 8**) durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente se realizan 3 lavados con Tris 0,05M + 1,5% tween-20 y un lavado con Tris 0,05M de 10' cada uno y se montan las muestras con solución de montaje.

\*Todas las incubaciones se realizan en un *termoblock* (Eppendorf) con agitación a 400rpm.

**2.6.10. Inmunohistoquímica de cortes congelados**

*Reactivos:* Tris 0,05M (Sigma), Tris 0,05M + 0,05% tween-20 (Sigma), Tris 0,05M + 0,05% tween-20 + 0,2% BSA (Sigma), anticuerpos primarios y secundarios, solución de montaje (Sigma).

*Procedimiento:* Antes de empezar con el protocolo, los portas con los tejidos se mantienen durante 15-30' a 37°C para una mejor adhesión de las muestras y evitar al máximo que los cortes se desprendan. Se inicia la

inmunohistoquímica con un lavado con Tris 0,05M, seguido por dos lavados con Tris 0,05M + 0,05% tween-20 de 10' cada uno. A continuación se incuba 2h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo, Tris 0,05M + 0,05% tween-20 + 0,2% BSA. Después se procede a la incubación O/N a 4°C con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (ver **Tabla 8**). Posteriormente se realizan 3 lavados de 10' con Tris 0,05M + 0,05% tween-20 y se incuba con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo (ver **Tabla 8**) durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente se realizan 3 lavados con Tris 0,05M + 0,05% tween-20 y un lavado con Tris 0,05M de 10' cada uno y se montan las muestras con la solución de montaje.

#### **2.6.11. Inmunohistoquímica de cortes en parafina**

*Reactivos:* Etanol 50-70-96-100% (Panreac), Tris 0,05M (Sigma), Tris 0,05M + 0,05% tween-20 (Sigma), Tris 0,05M + 0,05%tween-20 + 0,2%BSA (Sigma), anticuerpos primarios y secundarios, solución de montaje (Sigma).

*Procedimiento:* Antes de empezar con la inmunohistoquímica, se tienen que desparafinar y rehidratar las muestras. Inicialmente se realizan 2 inmersiones de 10' en xilol y posteriormente se someten las muestras a concentraciones decrecientes de etanol, en etanol 100% durante 5', en etanol 96% durante 5', en etanol 70% durante 5', en etanol 50% durante 5' y finalmente un lavado de 10' en agua. A continuación se inicia la inmunohistoquímica siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente para los cortes congelados.

#### **2.6.12. Análisis morfométrico de los cortes semifinos**

*Reactivos:* Microscopio (Olympus BX-40), cámara Olympus (DP-10) conectada a un ordenador, tableta digital (Wacom) y software ImageJ.

*Procedimiento:* Se toman fotos consecutivas de toda la sección semifina del nervio tibial a 100X aumentos para poder medir el área total del nervio y a 1000X para la morfometría de las fibras mielinizadas. Se analizan 300 axones

escogidos de secciones aleatorias del nervio tibial usando una tableta digital conectada a un ordenador y al software de análisis ImageJ, resiguiendo con un bolígrafo magnético la parte exterior e interior de cada fibra nerviosa. Con el software de análisis ImageJ y el área total del nervio, se calculan: el área y el diámetro de la fibra y del axón, el grosor de la mielina, la *g* ratio (diámetro axón/diámetro fibra) y la densidad de fibras mielinizadas.

## **2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados representados para los experimentos de realtime PCR y de western blot, se expresan como la media de los valores obtenidos  $\pm$  el error estándar de la media ( $SEM = SD$  (desviación típica)/ $\sqrt{n-1}$ ). Las diferencias entre grupos se analizaron por ANOVA unidireccional con un test posthoc de Bonferroni, considerando en ambos casos diferencias estadísticamente significativas (\*) para valores de  $p < 0,05$  y (\*\*) para valores de  $p < 0,01$  (Cumming *et al.*, 2007).



## ***BIBLIOGRAFÍA***



## A

- ABRAMS, C.K., OH, S., RI, Y., and BARGIELLO, T.A. (2000). Mutations in connexin 32: the molecular and biophysical bases for the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 203-214.
- ACHESON, K.J. (2010). Carbohydrate for weight and metabolic control: where do we stand? *Nutrition* **26**, 141-145.
- ADLKOFER, K., and LAI, C. (2000). Role of neuregulins in glial cell development. *Glia* **29**, 104-111.
- AGUILAR-REBOLLEDO, F. (2005). Guía clínica "Neuropatía Diabética" para médicos. *Plast & Rest Neurol* **4**, 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.
- AMBEGIA, E., ANSELL, S., CULLIS, P., HEYES, J., PALMER, L., and MACLACHLAN, I. (2005). Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1669**, 155-163.
- 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. *J Neurosci* **26**, 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.
- ANAND, P. (2004). Neurotrophic factors and their receptors in human sensory neuropathies. *Prog Brain Res* **146**, 477-492.
- ANDRIAMBELOSON, 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.
- ANITHA, M., GONDHA, C., SUTLIFF, R., PARSADANIAN, A., MWANGI, S., SITARAMAN, S.V., and SRINIVASAN, S. (2006). GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J Clin Invest* **116**, 344-356.
- ANTON, E.S., GHASHGHAIE, H.T., WEBER, J.L., MCCANN, C., FISCHER, T.M., CHEUNG, I.D., GASSMANN, M., MESSING, A., KLEIN, R., SCHWAB, M.H., LLOYD, K.C., and LAI, C. (2004). Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci* **7**, 1319-1328.
- APFEL, S.C. (2002). Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold? *Int Rev Neurobiol* **50**, 393-413.
- APPARAILLY, F., KHOURY, M., VERVOORDELONK, M.J., ADRIAANSEN, J., GICQUEL, E., PEREZ, N., RIVIERE, C., LOUIS-PLENCE, P., NOEL, D., DANOS, O., DOUAR, A.M., TAK, P.P., and JORGENSEN, C. (2005). Adeno-associated virus pseudotype 5 vector improves gene transfer in arthritic joints. *Hum Gene Ther* **16**, 426-434.
- ARRUDA, V.R., STEDMAN, H.H., NICHOLS, T.C., HASKINS, M.E., NICHOLSON, M., HERZOG, R.W., COUTO, L.B., and HIGH, K.A. (2005). Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model. *Blood* **105**, 3458-3464.
- ASKWITH, T., ZENG, W., EGGO, M.C., and STEVENS, M.J. (2009). Oxidative stress and dysregulation of the taurine transporter in high-glucose-exposed human Schwann cells: implications for pathogenesis of diabetic neuropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E620-628.

## B

- BAAKE, M., DOENECKE, D., and ALBIG, W. (2001). Characterisation of nuclear localisation signals of the four human core histones. *J Cell Biochem* **81**, 333-346.
- BARTON, W.A., LIU, B.P., TZVETKOVA, D., JEFFREY, P.D., FOURNIER, A.E., SAH, D., CATE, R., STRITTMATTER, S.M., and NIKOLOV, D.B. (2003). Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *Embo J* **22**, 3291-3302.

- BASCHAL, E.E., and EISENBARTH, G.S. (2008). Extreme genetic risk for type 1A diabetes in the post-genome era. *J Autoimmun* **31**, 1-6.
- BECK, R.W., BUCKINGHAM, B., MILLER, K., WOLPERT, H., XING, D., BLOCK, J.M., CHASE, H.P., HIRSCH, I., KOLLMAN, C., LAFFEL, L., LAWRENCE, J.M., MILASZEWSKI, K., RUEDY, K.J., and TAMBORLANE, W.V. (2009). Factors predictive of use and of benefit from continuous glucose monitoring in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **32**, 1947-1953.
- BEISWENGER, K.K., CALCUTT, N.A., and MIZISIN, A.P. (2008). Dissociation of thermal hypoalgesia and epidermal denervation in streptozotocin-diabetic mice. *Neurosci Lett* **442**, 267-272.
- BERGHS, S., AGGUJARO, D., DIRKX, R., JR., MAKSIMOVA, E., STABACH, P., HERMEL, J.M., ZHANG, J.P., PHILBRICK, W., SLEPNEV, V., ORT, T., and SOLIMENA, M. (2000). betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* **151**, 985-1002.
- BERGOFFEN, J., SCHERER, S.S., WANG, S., SCOTT, M.O., BONE, L.J., PAUL, D.L., CHEN, K., LENSCH, M.W., CHANCE, P.F., and FISCHBECK, K.H. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* **262**, 2039-2042.
- BERMINGHAM, J.R., JR., SCHERER, S.S., O'CONNELL, S., ARROYO, E., KALLA, K.A., POWELL, F.L., and ROSENFELD, M.G. (1996). Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. *Genes Dev* **10**, 1751-1762.
- BINDER, A., and BARON, R. (2010). Utility of transcutaneous electrical nerve stimulation in neurologic pain disorders. *Neurology* **74**, 104-105.
- BIRCHMEIER, C., and NAVE, K.A. (2008). Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia* **56**, 1491-1497.
- BJARNADOTTIR, M., MISNER, D.L., HAVERFIELD-GROSS, S., BRUUN, S., HELGASON, V.G., STEFANSSON, H., SIGMUNDSSON, A., FIRTH, D.R., NIELSEN, B., STEFANSDOTTIR, R., NOVAK, T.J., STEFANSSON, K., GURNEY, M.E., and ANDRESSON, T. (2007). Neuregulin1 (NRG1) signaling through Fyn modulates NMDA receptor phosphorylation: differential synaptic function in NRG1+/- knock-outs compared with wild-type mice. *J Neurosci* **27**, 4519-4529.
- BJARTMAR, C., YIN, X., and TRAPP, B.D. (1999). Axonal pathology in myelin disorders. *J Neurocytol* **28**, 383-395.
- BOESGAARD, T.W., PRUHOVA, S., ANDERSSON, E.A., CINEK, O., OBERMANNOVA, B., LAUENBORG, J., DAMM, P., BERGHOLDT, R., POCIOT, F., PISINGER, C., BARBETTI, F., LEBL, J., PEDERSEN, O., and HANSEN, T. (2010). Further evidence that mutations in INS can be a rare cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY). *BMC Med Genet* **11**, 42.
- BOGGS, J.M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1945-1961.
- BOGGS, J.M., and RANGARAJ, G. (2000). Interaction of lipid-bound myelin basic protein with actin filaments and calmodulin. *Biochemistry* **39**, 7799-7806.
- BOGGS, J.M., RANGARAJ, G., GAO, W., and HENG, Y.M. (2006). Effect of phosphorylation of myelin basic protein by MAPK on its interactions with actin and actin binding to a lipid membrane in vitro. *Biochemistry* **45**, 391-401.
- BOGGS, J.M., RANGARAJ, G., HILL, C.M., BATES, I.R., HENG, Y.M., and HARAUZ, G. (2005). Effect of arginine loss in myelin basic protein, as occurs in its deiminated charge isoform, on mediation of actin polymerization and actin binding to a lipid membrane in vitro. *Biochemistry* **44**, 3524-3534.
- BONDURAND, N., GIRARD, M., PINGAULT, V., LEMORT, N., DUBOURG, O., and GOOSSENS, M. (2001). Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet* **10**, 2783-2795.
- 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.
- BRINKMANN, B.G., AGARWAL, A., SEREDA, M.W., GARRATT, A.N., MULLER, T., WENDE, H., STASSART, R.M., NAWAZ, S., HUMML, C., VELANAC, V., RADYUSHKIN, K., GOEBBELS, S., FISCHER, T.M., FRANKLIN, R.J., LAI, C., EHRENREICH, H.,

- BIRCHMEIER, C., SCHWAB, M.H., and NAVE, K.A. (2008). Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* **59**, 581-595.
- BRITSCH, S., GOERICH, D.E., RIETHMACHER, D., PEIRANO, R.I., ROSSNER, M., NAVE, K.A., BIRCHMEIER, C., and WEGNER, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* **15**, 66-78.
- BRITSCH, S., LI, L., KIRCHHOFF, S., THEURING, F., BRINKMANN, V., BIRCHMEIER, C., and RIETHMACHER, D. (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* **12**, 1825-1836.
- BROWNLEE, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-820.
- BRUSSEE, V., CUNNINGHAM, F.A., and ZOCHODNE, D.W. (2004). Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. *Diabetes* **53**, 1824-1830.
- BRUSSEE, V., GUO, G., DONG, Y., CHENG, C., MARTINEZ, J.A., SMITH, D., GLAZNER, G.W., FERNYHOUGH, P., and ZOCHODNE, D.W. (2008). Distal degenerative sensory neuropathy in a long-term type 2 diabetes rat model. *Diabetes* **57**, 1664-1673.
- BUONANNO, A., and FISCHBACH, G.D. (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 287-296.
- BURGER C, E.A. (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.M., KIFF, J., HUBBARD, P., and BERRY, M. (2002). Synantocytes: new functions for novel NG2 expressing glia. *J Neurocytol* **31**, 551-565.

## C

- CALCUTT, N.A. (2004). Experimental models of painful diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* **220**, 137-139.
- CALCUTT NA, E.A. (1992). Reduced ciliary neurotrophic factor-like activity in nerves from diabetic or galactose-fed rats. *Brain Res* **575**, 320-324.
- CALCUTT NA, E.A. (2004). Ciliary neurotrophic factor improves nerve conduction and ameliorates regeneration deficits in diabetic rats. *Diabetes* **53**, 1807-1812.
- CAMBULI, V.M., INCANI, M., COSSU, E., CONGIU, T., SCANO, F., PILIA, S., SENTINELLI, F., TIBERTI, C., CAVALLO, M.G., LOCHE, S., and BARONI, M.G. (2009). Prevalence of Type 1 Diabetes auto-antibodies (GADA, IA2, IAA) in overweight and obese children. *Diabetes Care*.
- CAMERON, N.E., and COTTER, M.A. (2007). The neurocytokine, interleukin-6, corrects nerve dysfunction in experimental diabetes. *Exp Neurol* **207**, 23-29.
- CAMERON, N.E., JACK, A.M., and COTTER, M.A. (2001a). Effect of alpha-lipoic acid on vascular responses and nociception in diabetic rats. *Free Radic Biol Med* **31**, 125-135.
- CAMERON, N.E., TUCK, Z., MCCABE, L., and COTTER, M.A. (2001b). Effect of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes. *Diabetologia* **44**, 1161-1169.
- CAPOLUONGO, E., PITOCCHO, D., SANTONOCITO, C., CONCOLINO, P., SANTINI, S.A., MANTO, A., LULLI, P., GHIRLANDA, G., ZUPPI, C., and AMEGLIO, F. (2006). Association between serum free IGF-I and IGFBP-3 levels in type-I diabetes patients affected with associated autoimmune diseases or diabetic complications. *Eur Cytokine Netw* **17**, 167-174.
- CARROLL, S.L., MILLER, M.L., FROHNERT, P.W., KIM, S.S., and CORBETT, J.A. (1997). Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci* **17**, 1642-1659.
- CARTIER, N., HACEIN-BEY-ABINA, S., BARTHOLOMAE, C.C., VERES, G., SCHMIDT, M., KUTSCHERA, I., VIDAUD, M., ABEL, U., DAL-CORTIVO, L., CACCAVELLI, L., MAHLAOU, N., KIERMER, V., MITTELSTAEDT, D., BELLESME, C., LAHLOU, N., LEFRERE, F., BLANCHE, S., AUDIT, M., PAYEN, E., LEBOULCH, P., L'HOMME, B., BOUGNERES, P., VON KALLE, C., FISCHER, A., CAVAZZANA-CALVO, M., and AUBOURG, P. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* **326**, 818-823.

- CATTOGLIO, C., FACCHINI, G., SARTORI, D., ANTONELLI, A., MICCIO, A., CASSANI, B., SCHMIDT, M., VON KALLE, C., HOWE, S., THRASHER, A.J., AIUTI, A., FERRARI, G., RECCHIA, A., and MAVILIO, F. (2007). Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* **110**, 1770-1778.
- CEARLEY CN, W.J. (2006). Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol Ther* **12**, 528-537.
- CIRON, C., CRESSANT, A., ROUX, F., RAOUL, S., CHEREL, Y., HANTRAYE, P., DEGLON, N., SCHWARTZ, B., BARKATS, M., HEARD, J.M., TARDIEU, M., MOULLIER, P., and COLLE, M.A. (2009). AAV1-, AAV2- and AAV5-Mediated human alpha-Iduronidase Gene Transfer In The Brain of Nonhuman Primate: Vector Diffusion and Bio Distribution. *Hum Gene Ther*.
- COOPER, J.D., WALKER, N.M., SMYTH, D.J., DOWNES, K., HEALY, B.C., and TODD, J.A. (2009). Follow-up of 1715 SNPs from the Wellcome Trust Case Control Consortium genome-wide association study in type I diabetes families. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S85-94.
- COPELMAN, C.A., CUZNER, M.L., GROOME, N., and DIEMEL, L.T. (2000). Temporal analysis of growth factor mRNA expression in myelinating rat brain aggregate cultures: increments in CNTF, FGF-2, IGF-I, and PDGF-AA mRNA are induced by antibody-mediated demyelination. *Glia* **30**, 342-351.
- CRAIG, A.T., GAVRILOVA, O., DWYER, N.K., JOU, W., PACK, S., LIU, E., PECHHOLD, K., SCHMIDT, M., MCALISTER, V.J., CHIORINI, J.A., BLANCHETTE-MACKIE, E.J., HARLAN, D.M., and OWENS, R.A. (2009). Transduction of rat pancreatic islets with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *Virology* **6**, 61.
- CROVELLO, C.S., LAI, C., CANTLEY, L.C., and CARRAWAY, K.L., 3RD. (1998). Differential signaling by the epidermal growth factor-like growth factors neuregulin-1 and neuregulin-2. *J Biol Chem* **273**, 26954-26961.
- CUMMING, G., FIDLER, F., and VAUX, D.L. (2007). Error bars in experimental biology. *J Cell Biol* **177**, 7-11.
- CUNHA, J.M., JOLIVALT, C.G., RAMOS, K.M., GREGORY, J.A., CALCUTT, N.A., and MIZISIN, A.P. (2008). Elevated lipid peroxidation and DNA oxidation in nerve from diabetic rats: effects of aldose reductase inhibition, insulin, and neurotrophic factors. *Metabolism* **57**, 873-881.
- CHANDROSS, K.J., KESSLER, J.A., COHEN, R.I., SIMBURGER, E., SPRAY, D.C., BIERI, P., and DERMIETZEL, R. (1996). Altered connexin expression after peripheral nerve injury. *Mol Cell Neurosci* **7**, 501-518.
- CHATTOPADHYAY M, E.A. (2005). 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., VELARDEZ, M.O., WAROT, X., YU, Z.X., MILLER, S.J., CROS, D., and CORFAS, G. (2006). Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci* **26**, 3079-3086.
- CHEN, Y.J., JOHNSON, M.A., LIEBERMAN, M.D., GOODCHILD, R.E., SCHOBEL, S., LEWANDOWSKI, N., ROSOKLIJA, G., LIU, R.C., GINGRICH, J.A., SMALL, S., MOORE, H., DWORK, A.J., TALMAGE, D.A., and ROLE, L.W. (2008). Type III neuregulin-1 is required for normal sensorimotor gating, memory-related behaviors, and corticostriatal circuit components. *J Neurosci* **28**, 6872-6883.
- CHENG, H., WOLFE, S.H., VALENCIA, V., QIAN, K., SHEN, L., PHILLIPS, M.I., CHANG, L.J., and ZHANG, Y.C. (2007). Efficient and persistent transduction of exocrine and endocrine pancreas by adeno-associated virus type 8. *J Biomed Sci* **14**, 585-594.
- CHENG, H.L., RUSSELL, J.W., and FELDMAN, E.L. (1999). IGF-I promotes peripheral nervous system myelination. *Ann N Y Acad Sci* **883**, 124-130.
- CHENG, H.L., STEINWAY, M.L., RUSSELL, J.W., and FELDMAN, E.L. (2000). GTPases and phosphatidylinositol 3-kinase are critical for insulin-like growth factor-I-mediated Schwann cell motility. *J Biol Chem* **275**, 27197-27204.
- CHENG, H.T., DAUCH, J.R., HAYES, J.M., HONG, Y., and FELDMAN, E.L. (2009). Nerve growth factor mediates mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 1229-1243.
- CHOEIRI, C., HEWITT, K., DURKIN, J., SIMARD, C.J., RENAUD, J.M., and MESSIER, C. (2005). Longitudinal evaluation of memory performance and peripheral neuropathy in the Ins2C96Y Akita mice. *Behav Brain Res* **157**, 31-38.

- CHRISTIANSON, J.A., RIEKHOF, J.T., and WRIGHT, D.E. (2003a). Restorative effects of neurotrophin treatment on diabetes-induced cutaneous axon loss in mice. *Exp Neurol* **179**, 188-199.
- CHRISTIANSON, J.A., RYALS, J.M., MCCARSON, K.E., and WRIGHT, D.E. (2003b). Beneficial actions of neurotrophin treatment on diabetes-induced hypoalgesia in mice. *J Pain* **4**, 493-504.
- 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**

- D'ANTONI, S., BERRETTA, A., BONACCORSO, C.M., BRUNO, V., ARONICA, E., NICOLETTI, F., and CATANIA, M.V. (2008). Metabotropic glutamate receptors in glial cells. *Neurochem Res* **33**, 2436-2443.
- DANIS, R.P., and SHEETZ, M.J. (2009). Ruboxistaurin: PKC-beta inhibition for complications of diabetes. *Expert Opin Pharmacother* **10**, 2913-2925.
- DASHIELL, S.M., TANNER, S.L., PANT, H.C., and QUARLES, R.H. (2002). Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases. *J Neurochem* **81**, 1263-1272.
- DAVIS, J.Q., LAMBERT, S., and BENNETT, V. (1996). Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* **135**, 1355-1367.
- DE WIT J, E.R., EVERS R, CASTREN E, 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.
- DEGANO, A.L., and ROTH, G.A. (2009). Synapsin-induced proliferation of T-cell lines against myelin basic protein obtained from rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmunity* **42**, 661-666.
- DELANEY, C.L., CHENG, H.L., and FELDMAN, E.L. (1999). Insulin-like growth factor-I prevents caspase-mediated apoptosis in Schwann cells. *J Neurobiol* **41**, 540-548.
- DEMIOT, C., TARTAS, M., FROMY, B., ABRAHAM, P., SAUMET, J.L., and SIGAUDO-ROUSSEL, D. (2006). Aldose reductase pathway inhibition improved vascular and C-fiber functions, allowing for pressure-induced vasodilation restoration during severe diabetic neuropathy. *Diabetes* **55**, 1478-1483.
- DENARIER, E., FORGHANI, R., FARHADI, H.F., DIB, S., DIONNE, N., FRIEDMAN, H.C., LEPAGE, P., HUDSON, T.J., DROUIN, R., and PETERSON, A. (2005). Functional organization of a Schwann cell enhancer. *J Neurosci* **25**, 11210-11217.
- DESMAZIERES, A., DECKER, L., VALLAT, J.M., CHARNAY, P., and GILARDI-HEBENSTREIT, P. (2008). Disruption of Krox20-Nab interaction in the mouse leads to peripheral neuropathy with biphasic evolution. *J Neurosci* **28**, 5891-5900.
- DEVIGILI, G., TUGNOLI, V., PENZA, P., CAMOZZI, F., LOMBARDI, R., MELLI, G., BROGLIO, L., GRANIERI, E., and LAURIA, G. (2008). The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. *Brain* **131**, 1912-1925.
- DIB, S.A., and GOMES, M.B. (2009). Etiopathogenesis of type 1 diabetes mellitus: prognostic factors for the evolution of residual beta cell function. *Diabetol Metab Syndr* **1**, 25.
- DONELLO, J.E., LOEB, J.E., and HOPE, T.J. (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* **72**, 5085-5092.
- DONG, Z., SINANAN, A., PARKINSON, D., PARMANTIER, E., MIRSKY, R., and JESSEN, K.R. (1999). Schwann cell development in embryonic mouse nerves. *J Neurosci Res* **56**, 334-348.
- DOTTA, F., CENSINI, S., VAN HALTEREN, A.G., MARSELLI, L., MASINI, M., DIONISI, S., MOSCA, F., BOGGI, U., MUDA, A.O., PRATO, S.D., ELLIOTT, J.F., COVACCI, A., RAPPUOLI, R., ROEP, B.O., and MARCHETTI, P. (2007). Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5115-5120.
- DOTY, P., RUDD, G.D., STOEHR, T., and THOMAS, D. (2007). Lacosamide. *Neurotherapeutics* **4**, 145-148.

- DOWSING, B.J., MORRISON, W.A., NICOLA, N.A., STARKEY, G.P., BUCCI, T., and KILPATRICK, T.J. (1999). Leukemia inhibitory factor is an autocrine survival factor for Schwann cells. *J Neurochem* **73**, 96-104.
- 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.
- DREL, V.R., PACHER, P., ALI, T.K., SHIN, J., JULIUS, U., EL-REMESSY, A.B., and OBROSOVA, I.G. (2008). Aldose reductase inhibitor fidarestat counteracts diabetes-associated cataract formation, retinal oxidative-nitrosative stress, glial activation, and apoptosis. *Int J Mol Med* **21**, 667-676.
- DUBINSKY, R.M., and MIYASAKI, J. (2010). Assessment: efficacy of transcutaneous electric nerve stimulation in the treatment of pain in neurologic disorders (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **74**, 173-176.
- DUBOIS-DALCQ, M., and MURRAY, K. (2000). Why are growth factors important in oligodendrocyte physiology? *Pathol Biol (Paris)* **48**, 80-86.
- 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.

## E

- ECKERSLEY, L. (2002). Role of the Schwann cell in diabetic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* **50**, 293-321.
- EKBERG, K., BRISMAR, T., JOHANSSON, B.L., LINDSTROM, P., JUNTTI-BERGGREN, L., NORRBY, A., BERNE, C., ARNQVIST, H.J., BOLINDER, J., and WAHREN, J. (2007). C-Peptide replacement therapy and sensory nerve function in type 1 diabetic neuropathy. *Diabetes Care* **30**, 71-76.
- EKBERG, K., and JOHANSSON, B.L. (2008). Effect of C-peptide on diabetic neuropathy in patients with type 1 diabetes. *Exp Diabetes Res* **2008**, 457912.
- 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.
- ERLICH, H.A., LOHMAN, K., MACK, S.J., VALDES, A.M., JULIER, C., MIREL, D., NOBLE, J.A., MORAHAN, G.E., and RICH, S.S. (2009a). Association analysis of SNPs in the IL4R locus with type I diabetes. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S33-41.
- ERLICH, H.A., VALDES, A.M., JULIER, C., MIREL, D., and NOBLE, J.A. (2009b). Evidence for association of the TCF7 locus with type I diabetes. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S54-59.

## F

- FALLS, D.L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* **284**, 14-30.
- FEIGIN, A., KAPLITT, M.G., TANG, C., LIN, T., MATTIS, P., DHAWAN, V., DURING, M.J., and EIDELBERG, D. (2007). Modulation of metabolic brain networks after subthalamic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19559-19564.
- FELDMAN, E.L., SULLIVAN, K.A., KIM, B., and RUSSELL, J.W. (1997). Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiol Dis* **4**, 201-214.
- FERNANDES, R., GIRAO, H., and PEREIRA, P. (2004). High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin 43 by a proteasome-dependent mechanism. *J Biol Chem* **279**, 27219-27224.
- FERNYHOUGH, P., DIEMEL, L.T., and TOMLINSON, D.R. (1998). Target tissue production and axonal transport of neurotrophin-3 are reduced in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* **41**, 300-306.
- FERNYHOUGH, P., WILLARS, G.B., LINDSAY, R.M., and TOMLINSON, D.R. (1993). Insulin and insulin-like growth factor I enhance regeneration in cultured adult rat sensory neurones. *Brain Res* **607**, 117-124.
- FFRENCH-CONSTANT, C., COLOGNATO, H., and FRANKLIN, R.J. (2004). Neuroscience. The mysteries of myelin unwrapped. *Science* **304**, 688-689.

- FIGUEROA-ROMERO, C., SADIDI, M., and FELDMAN, E.L. (2008). Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Rev Endocr Metab Disord* **9**, 301-314.
- FISCHER, D., LI, Y., AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J., and KISSEL, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **24**, 1121-1131.
- FISHER, K.J., KELLEY, W.M., BURDA, J.F., and WILSON, J.M. (1996). A novel adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the AAV genome. *Hum Gene Ther* **7**, 2079-2087.
- FLAMES, N., LONG, J.E., GARRATT, A.N., FISCHER, T.M., GASSMANN, M., BIRCHMEIER, C., LAI, C., RUBENSTEIN, J.L., and MARIN, O. (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* **44**, 251-261.
- FLOTTE, T., CARTER, B., CONRAD, C., GUGGINO, W., REYNOLDS, T., ROSENSTEIN, B., TAYLOR, G., WALDEN, S., and WETZEL, R. (1996). A phase I study of an adenovirus-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* **7**, 1145-1159.
- FLOTTE, T.R. (2005). Adeno-associated virus-mediated gene transfer for lung diseases. *Hum Gene Ther* **16**, 643-648.
- FLOTTE, T.R., BRANTLY, M.L., SPENCER, L.T., BYRNE, B.J., SPENCER, C.T., BAKER, D.J., and HUMPHRIES, M. (2004). Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther* **15**, 93-128.
- FLOTTE, T.R., ZEITLIN, P.L., REYNOLDS, T.C., HEALD, A.E., PEDERSEN, P., BECK, S., CONRAD, C.K., BRASS-ERNST, L., HUMPHRIES, M., SULLIVAN, K., WETZEL, R., TAYLOR, G., CARTER, B.J., and GUGGINO, W.B. (2003). Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther* **14**, 1079-1088.
- FOULIS, A.K. (2008). Pancreatic pathology in type 1 diabetes in human. *Novartis Found Symp* **292**, 2-13; discussion 13-18, 122-129, 202-213.
- FOURNIER, A.E., GRANDPRE, T., and STRITTMATTER, S.M. (2001). Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **409**, 341-346.
- 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.
- FREEMAN, R.S., BURCH, R.L., CROWDER, R.J., LOMB, D.J., SCHOELL, M.C., STRAUB, J.A., and XIE, L. (2004). NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand? *Prog Brain Res* **146**, 111-126.

## G

- GALLEGO, R.G., BLANCO, J.L., THIJSSSEN-VAN ZUYLEN, C.W., GOTFREDSEN, C.H., VOSHOL, H., DUUS, J.O., SCHACHNER, M., and VLIEGENTHART, J.F. (2001). Epitope diversity of N-glycans from bovine peripheral myelin glycoprotein P0 revealed by mass spectrometry and nano probe magic angle spinning <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **276**, 30834-30844.
- GANDHI, G.K., BALL, K.K., CRUZ, N.F., and DIENEL, G.A. (2010). Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro* **2**, e00030.
- GAO, G., ALVIRA, M.R., SOMANATHAN, S., LU, Y., VANDENBERGHE, L.H., RUX, J.J., CALCEDO, R., SANMIGUEL, J., ABBAS, Z., and WILSON, J.M. (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6081-6086.
- GAO, X., KIM, K.S., and LIU, D. (2007). Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *Aaps J* **9**, E92-104.
- 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.
- GATZINSKY KP, E.A. (2003). Early onset of degenerative changes at nodes of Ranvier in alpha-motor axons of CNTF Null mutant mice. *Glia* **42**, 340-349.
- GEORGIADIS, A., TSCHERNUTTER, M., BAINBRIDGE, J.W., ROBBIE, S.J., MCINTOSH, J., NATHWANI, A.C., SMITH, A.J., and ALI, R.R. (2010). AAV-mediated knockdown of peripherin-2 in vivo using miRNA-based hairpins. *Gene Ther* **17**, 486-493.
- GHISLAIN, J., and CHARNAY, P. (2006). Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep* **7**, 52-58.
- GHISLAIN, J., DESMARQUET-TRIN-DINH, C., JAEGLE, M., MEIJER, D., CHARNAY, P., and FRAIN, M. (2002). Characterisation of cis-acting sequences reveals a biphasic, axon-dependent regulation of Krox20 during Schwann cell development. *Development* **129**, 155-166.
- GIANNINI, S., BENVENUTI, S., LUCIANI, P., MANUELLI, C., CELLAI, I., DELEDDA, C., PEZZATINI, A., VANNELLI, G.B., MANESCHI, E., ROTELLA, C.M., SERIO, M., and PERI, A. (2008). Intermittent high glucose concentrations reduce neuronal precursor survival by altering the IGF system: the involvement of the neuroprotective factor DHCR24 (Seladin-1). *J Endocrinol* **198**, 523-532.
- GIDAL, B.E. (2006). New and emerging treatment options for neuropathic pain. *Am J Manag Care* **12**, S269-278.
- GOMEZ-GONZALO, M., LOSI, G., CHIAVEGATO, A., ZONTA, M., CAMMAROTA, M., BRONDI, M., VETRI, F., UVA, L., POZZAN, T., DE CURTIS, M., RATTO, G.M., and CARMIGNOTO, G. (2010). An excitatory loop with astrocytes contributes to drive neurons to seizure threshold. *PLoS Biol* **8**, e1000352.
- GOMEZ-GUTIERREZ, J.G., RAO, X.M., GARCIA-GARCIA, A., HAO, H., MCMASTERS, K.M., and ZHOU, H.S. (2010). Developing adenoviral vectors encoding therapeutic genes toxic to host cells: comparing binary and single-inducible vectors expressing truncated E2F-1. *Virology* **397**, 337-345.
- GOMEZ-SANCHEZ, J.A., LOPEZ DE ARMENTIA, M., LUJAN, R., KESSARIS, N., RICHARDSON, W.D., and CABEDO, H. (2009). Sustained axon-glial signaling induces Schwann cell hyperproliferation, Remak bundle myelination, and tumorigenesis. *J Neurosci* **29**, 11304-11315.
- GOODEARL, A.D., YEE, A.G., SANDROCK, A.W., JR., CORFAS, G., and FISCHBACH, G.D. (1995). ARIA is concentrated in the synaptic basal lamina of the developing chick neuromuscular junction. *J Cell Biol* **130**, 1423-1434.
- GOPARAJU, G.N., SATISHCHANDRAN, C., and GUPTA, P.K. (2009). The effect of the structure of small cationic peptides on the characteristics of peptide-DNA complexes. *Int J Pharm* **369**, 162-169.
- 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.
- GRINSPAN, J.B., MARCHIONNI, M.A., REEVES, M., COULALOGLOU, M., and SCHERER, S.S. (1996). Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci* **16**, 6107-6118.
- GUMY, L.F., BAMPTON, E.T., and TOLKOVSKY, A.M. (2008). Hyperglycaemia inhibits Schwann cell proliferation and migration and restricts regeneration of axons and Schwann cells from adult murine DRG. *Mol Cell Neurosci* **37**, 298-311.

## H

- HA, S.O., KIM, J.K., HONG, H.S., KIM, D.S., and CHO, H.J. (2001). Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. *Neuroscience* **107**, 301-309.
- HACKER, U.T., WINGENFELD, L., KOFLE, D.M., SCHUHMANN, N.K., LUTZ, S., HEROLD, T., KING, S.B., GERNER, F.M., PERABO, L., RABINOWITZ, J., MCCARTY, D.M., SAMULSKI, R.J., HALLEK, M., and BUNING, H. (2005). Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. *J Gene Med* **7**, 1429-1438.

- HAGEDORN, L., SUTER, U., and SOMMER, L. (1999). P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF-beta family factors. *Development* **126**, 3781-3794.
- HAGIWARA, N., IMADA, S., and SUEOKA, N. (1993). Cell-type specific segregation of transcriptional expression of glial genes in the rat peripheral neurotumor RT4 cell lines. *J Neurosci Res* **36**, 646-656.
- HAI, M., MUJA, N., DEVRIES, G.H., QUARLES, R.H., and PATEL, P.I. (2002). Comparative analysis of Schwann cell lines as model systems for myelin gene transcription studies. *J Neurosci Res* **69**, 497-508.
- HARAUZ, G., ISHIYAMA, N., and BATES, I.R. (2000). Analogous structural motifs in myelin basic protein and in MARCKS. *Mol Cell Biochem* **209**, 155-163.
- HARAUZ, G., LADIZHANSKY, V., and BOGGS, J.M. (2009). Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry* **48**, 8094-8104.
- HARPER, S.Q., and GONZALEZ-ALEGRE, P. (2008). Lentivirus-mediated RNA interference in mammalian neurons. *Methods Mol Biol* **442**, 95-112.
- HARRISON, P.J., and LAW, A.J. (2006). Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biol Psychiatry* **60**, 132-140.
- HARVEY AR, E.A. (2006). AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells. *Gene Therapy* **13**, 138-141.
- HAYASAKA, K., HIMORO, M., WANG, Y., TAKATA, M., MINOSHIMA, S., SHIMIZU, N., MIURA, M., UYEMURA, K., and TAKADA, G. (1993). Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ). *Genomics* **17**, 755-758.
- HE, C., ZHANG, C., HUNTER, D.J., HANKINSON, S.E., BUCK LOUIS, G.M., HEDIGER, M.L., and HU, F.B. (2010). Age at menarche and risk of type 2 diabetes: results from 2 large prospective cohort studies. *Am J Epidemiol* **171**, 334-344.
- HERZOG, R.W., FIELDS, P.A., ARRUDA, V.R., BRUBAKER, J.O., ARMSTRONG, E., MCCLINTOCK, D., BELLINGER, D.A., COUTO, L.B., NICHOLS, T.C., and HIGH, K.A. (2002). Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther* **13**, 1281-1291.
- HILL, R. (2009). Extracellular matrix remodelling in human diabetic neuropathy. *J Anat* **214**, 219-225.
- HOKE, A., GORDON, T., ZOCHODNE, D.W., and SULAIMAN, O.A. (2002). A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Exp Neurol* **173**, 77-85.
- 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. (2010). Teràpia gènica per neuropatia diabètica mitjançant vectors adeno-associats codificant pel factor de creixement I similar a la insulina. In *Bioquímica y Biología Molecular*. (Universidad Autónoma de Barcelona).
- HOMS, J., ARIZA, L., UDINA, E., NAVARRO, X., CHILLÓN, M., and BOSCH, A. (2010a). Schwann cell targeting via intrasciatic injection of AAV8 as gene therapy strategy for peripheral nerve regeneration. Submitted, *Gene Therapy*.
- HOMS, J., ARIZA, L., VERDU, E., CASALS, L., CHILLON, M., NAVARRO, X., and BOSCH, A. (2010b). Comparative study of peripheral neuropathy and nerve regeneration in NOD and ICR diabetic mice. Submitted, *Experimental Neurology*.
- HONDA, K., KOGUCHI, M., KOGA, K., NAKAJIMA, K., KOBAYASHI, F., MIGITA, K., OGATA, S., HIRABARA, Y., and TAKANO, Y. (2007). Contribution of Ca(2+) -dependent protein kinase C in the spinal cord to the development of mechanical allodynia in diabetic mice. *Biol Pharm Bull* **30**, 990-993.
- HORIUCHI, K., ZHOU, H.M., KELLY, K., MANOVA, K., and BLOBEL, C.P. (2005). Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins beta1 and beta2. *Dev Biol* **283**, 459-471.
- HOTTA, N., AKANUMA, Y., KAWAMORI, R., MATSUOKA, K., OKA, Y., SHICHIRI, M., TOYOTA, T., NAKASHIMA, M., YOSHIMURA, I., SAKAMOTO, N., and SHIGETA, Y. (2006). Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy: the 3-year, multicenter, comparative Aldose Reductase Inhibitor-Diabetes Complications Trial. *Diabetes Care* **29**, 1538-1544.

- HOWE, D.G., and MCCARTHY, K.D. (2000). Retroviral inhibition of cAMP-dependent protein kinase inhibits myelination but not Schwann cell mitosis stimulated by interaction with neurons. *J Neurosci* **20**, 3513-3521.
- HOWSON, J.M., WALKER, N.M., SMYTH, D.J., and TODD, J.A. (2009). Analysis of 19 genes for association with type 1 diabetes in the Type 1 Diabetes Genetics Consortium families. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S74-84.
- HU, X., HICKS, C.W., HE, W., WONG, P., MACKLIN, W.B., TRAPP, B.D., and YAN, R. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* **9**, 1520-1525.
- HUIJBERTS, M.S., SCHAPER, N.C., and SCHALKWIJK, C.G. (2008). Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes Metab Res Rev* **24 Suppl 1**, S19-24.
- HUIJBREGTS, R.P., ROTH, K.A., SCHMIDT, R.E., and CARROLL, S.L. (2003). Hypertrophic neuropathies and malignant peripheral nerve sheath tumors in transgenic mice overexpressing glial growth factor beta3 in myelinating Schwann cells. *J Neurosci* **23**, 7269-7280.
- HUSSAIN, I., POWELL, D., HOWLETT, D.R., TEW, D.G., MEEK, T.D., CHAPMAN, C., GLOGER, I.S., MURPHY, K.E., SOUTHAN, C.D., RYAN, D.M., SMITH, T.S., SIMMONS, D.L., WALSH, F.S., DINGWALL, C., and CHRISTIE, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* **14**, 419-427.

**I**

- IKEGAMI, H., FUJISAWA, T., KAWABATA, Y., NOSO, S., and OGIHARA, T. (2006). Genetics of type 1 diabetes: similarities and differences between Asian and Caucasian populations. *Ann N Y Acad Sci* **1079**, 51-59.
- ILNYTSKA, O., LYZOGUBOV, V.V., STEVENS, M.J., DREL, V.R., MASHTALIR, N., PACHER, P., YOREK, M.A., and OBROSOVA, I.G. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition alleviates experimental diabetic sensory neuropathy. *Diabetes* **55**, 1686-1694.
- INOUE, K., KHAJAVI, M., OHYAMA, T., HIRABAYASHI, S., WILSON, J., REGGIN, J.D., MANCIAS, P., BUTLER, I.J., WILKINSON, M.F., WEGNER, M., and LUPSKI, J.R. (2004). Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet* **36**, 361-369.
- ISHIDA, T., ICHIHARA, M., WANG, X., YAMAMOTO, K., KIMURA, J., MAJIMA, E., and KIWADA, H. (2006). Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* **112**, 15-25.
- IWAMOTO, N., WATANABE, A., YAMAMOTO, M., MIYAKE, N., KURAI, T., TERAMOTO, A., and SHIMADA, T. (2009). Global diffuse distribution in the brain and efficient gene delivery to the dorsal root ganglia by intrathecal injection of adeno-associated viral vector serotype 1. *J Gene Med* **11**, 498-505.
- IZUMI, T., YOKOTA-HASHIMOTO, H., ZHAO, S., WANG, J., HALBAN, P.A., and TAKEUCHI, T. (2003). Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* **52**, 409-416.

**J**

- JAEGLE, M., GHAZVINI, M., MANDEMAKERS, W., PIIRSOO, M., DRIEGEN, S., LEVAVASSEUR, F., RAGHOENATH, S., GROSVELD, F., and MEIJER, D. (2003). The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev* **17**, 1380-1391.
- JAEGLE, M., MANDEMAKERS, W., BROOS, L., ZWART, R., KARIS, A., VISSER, P., GROSVELD, F., and MEIJER, D. (1996). The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation. *Science* **273**, 507-510.
- JAHROMI, M.M., and EISENBARTH, G.S. (2007). Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cell Mol Life Sci* **64**, 865-872.
- JAIDANE, H., and HOBER, D. (2008). Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab* **34**, 537-548.

- JANG, S.W., LEBLANC, S.E., ROOPRA, A., WRABETZ, L., and SVAREN, J. (2006). In vivo detection of Egr2 binding to target genes during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* **98**, 1678-1687.
- JENSEN, T.S., MADSEN, C.S., and FINNERUP, N.B. (2009). Pharmacology and treatment of neuropathic pains. *Curr Opin Neurol* **22**, 467-474.
- JESSEN, K.R., and MIRSKY, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* **6**, 671-682.
- JETTEN, A.M., and SUTER, U. (2000). The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **64**, 97-129.
- JIANBO, L., CHENGYA, W., JIAWEI, C., XIAOLU, L., ZHENQING, F., and HONGTAI, M. (2002). The role of IGF-1 gene expression abnormality in pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. *Chin Med Sci J* **17**, 204-209.
- JIANG, F., FREDERICK, T.J., and WOOD, T.L. (2001). IGF-I synergizes with FGF-2 to stimulate oligodendrocyte progenitor entry into the cell cycle. *Dev Biol* **232**, 414-423.
- JIANG, H., GOMEZ-MANZANO, C., LANG, F.F., ALEMANY, R., and FUEYO, J. (2009). Oncolytic adenovirus: preclinical and clinical studies in patients with human malignant gliomas. *Curr Gene Ther* **9**, 422-427.
- JO, S.A., ZHU, X., MARCHIONNI, M.A., and BURDEN, S.J. (1995). Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression. *Nature* **373**, 158-161.
- JOY, S.V., SCATES, A.C., BEARELLY, S., DAR, M., TAULIEN, C.A., GOEBEL, J.A., and COONEY, M.J. (2005). Ruboxistaurin, a protein kinase C beta inhibitor, as an emerging treatment for diabetes microvascular complications. *Ann Pharmacother* **39**, 1693-1699.
- JUDGE, A., MCCLINTOCK, K., PHELPS, J.R., and MACLACHLAN, I. (2006). Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes. *Mol Ther* **13**, 328-337.
- JULIER, C., AKOLKAR, B., CONCANNON, P., MORAHAN, G., NIERRAS, C., and PUGLIESE, A. (2009). The Type I Diabetes Genetics Consortium 'Rapid Response' family-based candidate gene study: strategy, genes selection, and main outcome. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S121-127.
- JULIUS, D., and BASBAUM, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210.

## K

- KAMIYA, H., MURAKAWA, Y., ZHANG, W., and SIMA, A.A. (2005). Unmyelinated fiber sensory neuropathy differs in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **21**, 448-458.
- KAO, S.C., WU, H., XIE, J., CHANG, C.P., RANISH, J.A., GRAEF, I.A., and CRABTREE, G.R. (2009). Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science* **323**, 651-654.
- KAPLITT, M.G., FEIGIN, A., TANG, C., FITZSIMONS, H.L., MATTIS, P., LAWLOR, P.A., BLAND, R.J., YOUNG, D., STRYBING, K., EIDELBERG, D., and DURING, M.J. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* **369**, 2097-2105.
- KAWAI, T., TAKEI, I., TOKUI, M., FUNAE, O., MIYAMOTO, K., TABATA, M., HIRATA, T., SARUTA, T., SHIMADA, A., and ITOH, H. (2009). Effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes, in relation to suppression of N(varepsilon)-carboxymethyl lysine. *J Diabetes Complications*.
- KAWASHIMA, R., KOJIMA, H., NAKAMURA, K., ARAHATA, A., FUJITA, Y., TOKUYAMA, Y., SAITO, T., FURUDATE, S., KURIHARA, T., YAGISHITA, S., KITAMURA, K., and TAMAI, Y. (2007). Alterations in mRNA expression of myelin proteins in the sciatic nerves and brains of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Res* **32**, 1002-1010.
- KAY, M.A., MANNO, C.S., RAGNI, M.V., LARSON, P.J., COUTO, L.B., MCCLELLAND, A., GLADER, B., CHEW, A.J., TAI, S.J., HERZOG, R.W., ARRUDA, V., JOHNSON, F., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W., and HIGH, K.A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* **24**, 257-261.

- KELLER, M., TAGAWA, T., PREUSS, M., and MILLER, A.D. (2002). Biophysical characterization of the DNA binding and condensing properties of adenoviral core peptide mu. *Biochemistry* **41**, 652-659.
- KIM, B., LEVENTHAL, P.S., SALTIEL, A.R., and FELDMAN, E.L. (1997). Insulin-like growth factor-I-mediated neurite outgrowth in vitro requires mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **272**, 21268-21273.
- KIM, H.C., CHO, Y.J., AHN, C.W., PARK, K.S., KIM, J.C., NAM, J.S., IM, Y.S., LEE, J.E., LEE, S.C., and LEE, H.K. (2009). Nerve growth factor and expression of its receptors in patients with diabetic neuropathy. *Diabet Med* **26**, 1228-1234.
- KIM, S.J., GUPTA, R.C., and LEE, H.W. (2007). Taurine-diabetes interaction: from involvement to protection. *Curr Diabetes Rev* **3**, 165-175.
- KIMELBERG, H.K. (2010). Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist* **16**, 79-106.
- 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.
- KLIMCZAK, R.R., KOERBER, J.T., DALKARA, D., FLANNERY, J.G., and SCHAFFER, D.V. (2009). A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells. *PLoS One* **4**, e7467.
- KLUGMANN M, E.A. (2005). AAV-mediated hippocampal expression of short and long Homer1 proteins differentially affect cognition and seizure activity in adults rats. *Mol Cell Neurosci* **28**, 347-360.
- KOLSTAD, K.D., DALKARA, D., GUERIN, K., VISEL, M., HOFFMANN, N., SCHAFFER, D.V., and FLANNERY, J.G. (2010). Changes in Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Delivery in Retinal Degeneration. *Hum Gene Ther*.
- KORDELI, E., DAVIS, J., TRAPP, B., and BENNETT, V. (1990). An isoform of ankyrin is localized at nodes of Ranvier in myelinated axons of central and peripheral nerves. *J Cell Biol* **110**, 1341-1352.
- KORDELI, E., LAMBERT, S., and BENNETT, V. (1995). AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem* **270**, 2352-2359.
- KROENKE, K., KREBS, E.E., and BAIR, M.J. (2009). Pharmacotherapy of chronic pain: a synthesis of recommendations from systematic reviews. *Gen Hosp Psychiatry* **31**, 206-219.
- KUMAR, S., YIN, X., TRAPP, B.D., PAULAITIS, M.E., and HOH, J.H. (2002). Role of long-range repulsive forces in organizing axonal neurofilament distributions: evidence from mice deficient in myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci Res* **68**, 681-690.
- KWON, O.B., LONGART, M., VULLHORST, D., HOFFMAN, D.A., and BUONANNO, A. (2005). Neuregulin-1 reverses long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* **25**, 9378-9383.

## L

- LAUREN, J., HU, F., CHIN, J., LIAO, J., AIRAKSINEN, M.S., and STRITTMATTER, S.M. (2007). Characterization of myelin ligand complexes with neuronal Nogo-66 receptor family members. *J Biol Chem* **282**, 5715-5725.
- LAURIA, G., LOMBARDI, R., CAMOZZI, F., and DEVIGILI, G. (2009). Skin biopsy for the diagnosis of peripheral neuropathy. *Histopathology* **54**, 273-285.
- LAW, A.J., LIPSKA, B.K., WEICKERT, C.S., HYDE, T.M., STRAUB, R.E., HASHIMOTO, R., HARRISON, P.J., KLEINMAN, J.E., and WEINBERGER, D.R. (2006). Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6747-6752.
- LE DOUARIN, N.M., and DUPIN, E. (2003). Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 529-536.
- LE, N., NAGARAJAN, R., WANG, J.Y., ARAKI, T., SCHMIDT, R.E., and MILBRANDT, J. (2005a). Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2596-2601.

- LE, N., NAGARAJAN, R., WANG, J.Y., SVAREN, J., LAPASH, C., ARAKI, T., SCHMIDT, R.E., and MILBRANDT, J. (2005b). Nab proteins are essential for peripheral nervous system myelination. *Nat Neurosci* **8**, 932-940.
- LEBLANC, S.E., JANG, S.W., WARD, R.M., WRABETZ, L., and SVAREN, J. (2006). Direct regulation of myelin protein zero expression by the Egr2 transactivator. *J Biol Chem* **281**, 5453-5460.
- LEBLANC, S.E., SRINIVASAN, R., FERRI, C., MAGER, G.M., GILLIAN-DANIEL, A.L., WRABETZ, L., and SVAREN, J. (2005). Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* **93**, 737-748.
- LEBLANC, S.E., WARD, R.M., and SVAREN, J. (2007). Neuropathy-associated Egr2 mutants disrupt cooperative activation of myelin protein zero by Egr2 and Sox10. *Mol Cell Biol* **27**, 3521-3529.
- LEINNINGER, G.M., BACKUS, C., SASTRY, A.M., YI, Y.B., WANG, C.W., and FELDMAN, E.L. (2006). Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis* **23**, 11-22.
- LEINNINGER, G.M., VINCENT, A.M., and FELDMAN, E.L. (2004). The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* **9**, 26-53.
- LEMKE, L.B., ROGERS, A.B., NAMBIAR, P.R., and FOX, J.G. (2008). Obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus in Swiss-Webster mice associated with late-onset hepatocellular carcinoma. *J Endocrinol* **199**, 21-32.
- LEONE, P., JANSON, C.G., MCPHEE, S.J., and DURING, M.J. (1999). Global CNS gene transfer for a childhood neurogenetic enzyme deficiency: Canavan disease. *Curr Opin Mol Ther* **1**, 487-492.
- LEVI, A.D., BUNGE, R.P., LOFGREN, J.A., MEIMA, L., HEFTI, F., NIKOLICS, K., and SLIWKOWSKI, M.X. (1995). The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation. *J Neurosci* **15**, 1329-1340.
- LI, B., WOO, R.S., MEI, L., and MALINOW, R. (2007). The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* **54**, 583-597.
- LI, F., ABATAN, O.I., KIM, H., BURNETT, D., LARKIN, D., OBROSOVA, I.G., and STEVENS, M.J. (2006). Taurine reverses neurological and neurovascular deficits in Zucker diabetic fatty rats. *Neurobiol Dis* **22**, 669-676.
- LI, F., DREL, V.R., SZABO, C., STEVENS, M.J., and OBROSOVA, I.G. (2005a). Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. *Diabetes* **54**, 1514-1522.
- LI, F., OBROSOVA, I.G., ABATAN, O., TIAN, D., LARKIN, D., STUENKEL, E.L., and STEVENS, M.J. (2005b). Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signaling in sensory neurons of STZ-D rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E29-36.
- LI, M., HUSIC, N., LIN, Y., CHRISTENSEN, H., MALIK, I., MCIVER, S., DANIELS, C.M., HARRIS, D.A., KOTZBAUER, P.T., GOLDBERG, M.P., and SNIDER, B.J. (2010). Optimal promoter usage for lentiviral vector-mediated transduction of cultured central nervous system cells. *J Neurosci Methods*.
- LI, M., and ROSSI, J.J. (2008). Lentiviral vector delivery of siRNA and shRNA encoding genes into cultured and primary hematopoietic cells. *Methods Mol Biol* **433**, 287-299.
- LI, Q., and LOEB, J.A. (2001). Neuregulin-heparan-sulfate proteoglycan interactions produce sustained erbB receptor activation required for the induction of acetylcholine receptors in muscle. *J Biol Chem* **276**, 38068-38075.
- LI, S., TSENG, W.C., STOLZ, D.B., WU, S.P., WATKINS, S.C., and HUANG, L. (1999). Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther* **6**, 585-594.
- LI, W., ZHANG, L., JOHNSON, J.S., ZHIJIAN, W., GRIEGER, J.C., PING-JIE, X., DROUIN, L.M., AGBANDJE-MCKENNA, M., PICKLES, R.J., and SAMULSKI, R.J. (2009). Generation of novel AAV variants by directed evolution for improved CFTR delivery to human ciliated airway epithelium. *Mol Ther* **17**, 2067-2077.
- LIBICH, D.S., HILL, C.M., BATES, I.R., HALLETT, F.R., ARMSTRONG, S., SIEMIARCZUK, A., and HARAUZ, G. (2003). Interaction of the 18.5-kD isoform of myelin basic protein with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin: effects of deimination assessed by intrinsic Trp fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering, and circular dichroism. *Protein Sci* **12**, 1507-1521.

- 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.
- LIMPERT, A.S., and CARTER, B.D. (2010). Axonal neuregulin 1 type III activates NF- $\kappa$ B in schwann cells during myelin formation. *J Biol Chem*.
- LIN, X., KOELSCH, G., WU, S., DOWNS, D., DASHTI, A., and TANG, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1456-1460.
- 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. (2009a). Peripheral gene transfer of glial cell-derived neurotrophic factor ameliorates neuropathic deficits in diabetic rats. *Hum Gene Ther* **20**, 715-727.
- LIU, X., LUO, M., GUO, C., YAN, Z., WANG, Y., LEI-BUTTERS, D.C., and ENGELHARDT, J.F. (2009b). Analysis of adeno-associated virus progenitor cell transduction in mouse lung. *Mol Ther* **17**, 285-293.
- LIU, Y., FORD, B., MANN, M.A., and FISCHBACH, G.D. (2001). Neuregulins increase alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and enhance excitatory synaptic transmission in GABAergic interneurons of the hippocampus. *J Neurosci* **21**, 5660-5669.
- LOPEZ-BENDITO, G., CAUTINAT, A., SANCHEZ, J.A., BIELLE, F., FLAMES, N., GARRATT, A.N., TALMAGE, D.A., ROLE, L.W., CHARNAY, P., MARIN, O., and GAREL, S. (2006). Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* **125**, 127-142.
- LORAIN, S., GROSS, D.A., GOYENVALLE, A., DANOS, O., DAVOUST, J., and GARCIA, L. (2008). Transient immunomodulation allows repeated injections of AAV1 and correction of muscular dystrophy in multiple muscles. *Mol Ther* **16**, 541-547.
- LU, Y. (2004). Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy. *Stem Cells Dev* **13**, 133-145.
- LUKIC, I.K., HUMPERT, P.M., NAWROTH, P.P., and BIERHAUS, A. (2008). The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* **1126**, 76-80.
- LUNN, M.P., CRAWFORD, T.O., HUGHES, R.A., GRIFFIN, J.W., and SHEIKH, K.A. (2002). Anti-myelin-associated glycoprotein antibodies alter neurofilament spacing. *Brain* **125**, 904-911.

## M

- MA, L., LIU, J., SHEN, J., LIU, L., WU, J., LI, W., LUO, J., CHEN, Q., and QIAN, C. (2010). Expression of miR-122 mediated by adenoviral vector induces apoptosis and cell cycle arrest of cancer cells. *Cancer Biol Ther* **9**.
- MACKAY, P., JACOBSON, J., and RABINOVITCH, A. (1986). Spontaneous diabetes mellitus in the Bio-Breeding/Worcester rat. Evidence in vitro for natural killer cell lysis of islet cells. *J Clin Invest* **77**, 916-924.
- MAGOT, A., LATOUR, P., MUSSINI, J.M., MOURTADA, R., GUIHENEUC, P., and PEREON, Y. (2008). A new MPZ mutation associated with a mild CMT1 phenotype presenting with recurrent nerve compression. *Muscle Nerve* **38**, 1055-1059.
- MAGUIRE, A.M., HIGH, K.A., AURICCHIO, A., WRIGHT, J.F., PIERCE, E.A., TESTA, F., MINGOZZI, F., BENNICELLI, J.L., YING, G.S., ROSSI, S., FULTON, A., MARSHALL, K.A., BANFI, S., CHUNG, D.C., MORGAN, J.I., HAUCK, B., ZELENIAIA, O., ZHU, X., RAFFINI, L., COPPIETERS, F., DE BAERE, E., SHINDLER, K.S., VOLPE, N.J., SURACE, E.M., ACERRA, C., LYUBARSKY, A., REDMOND, T.M., STONE, E., SUN, J., MCDONNELL, J.W., LEROY, B.P., SIMONELLI, F., and BENNETT, J. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* **374**, 1597-1605.
- MAHESHRI N, K.J., KASPAR BK, SCHAFFER DV. (2006). Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol* **24**, 198-2004.
- MAKINO, A., PLATOSHYN, O., SUAREZ, J., YUAN, J.X., and DILLMANN, W.H. (2008). Downregulation of connexin40 is associated with coronary endothelial cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C221-230.
- MAMBETISAEVA, E.T., GIRE, V., and EVANS, W.H. (1999). Multiple connexin expression in peripheral nerve, Schwann cells, and Schwannoma cells. *J Neurosci Res* **57**, 166-175.

- MANDICH, P., MANCARDI, G.L., VARESE, A., SORIANI, S., DI MARIA, E., BELLONE, E., BADO, M., GROSS, L., WINDEBANK, A.J., AJMAR, F., and SCHENONE, A. (1999). Congenital hypomyelination due to myelin protein zero Q215X mutation. *Ann Neurol* **45**, 676-678.
- MANNIE, M., SWANBORG, R.H., and STEPANIAK, J.A. (2009). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 15**, Unit 15 12.
- MANNO, C.S., CHEW, A.J., HUTCHISON, S., LARSON, P.J., HERZOG, R.W., ARRUDA, V.R., TAI, S.J., RAGNI, M.V., THOMPSON, A., OZELO, M., COUTO, L.B., LEONARD, D.G., JOHNSON, F.A., MCCLELLAND, A., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W., KAY, M.A., HIGH, K.A., and GLADER, B. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**, 2963-2972.
- MANNO, C.S., PIERCE, G.F., ARRUDA, V.R., GLADER, B., RAGNI, M., RASKO, J.J., OZELO, M.C., HOOTS, K., BLATT, P., KONKLE, B., DAKE, M., KAYE, R., RAZAVI, M., ZAJKO, A., ZEHNDER, J., RUSTAGI, P.K., NAKAI, H., CHEW, A., LEONARD, D., WRIGHT, J.F., LESSARD, R.R., SOMMER, J.M., TIGGES, M., SABATINO, D., LUK, A., JIANG, H., MINGOZZI, F., COUTO, L., ERTL, H.C., HIGH, K.A., and KAY, M.A. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**, 342-347.
- MARCHINI, C., MARSALA, S.Z., BENDINI, M., TAIOLI, F., DAMANTE, G., LONIGRO, I.R., and FABRIZI, G.M. (2009). Myelin protein zero Val102fs mutation manifesting with isolated spinal root hypertrophy. *Neuromuscul Disord* **19**, 849-852.
- MARQUES, W., JR., HANNA, M.G., MARQUES, S.R., SWEENEY, M.G., THOMAS, P.K., and WOOD, N.W. (1999). Phenotypic variation of a new P0 mutation in genetically identical twins. *J Neurol* **246**, 596-599.
- 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., and SCHACHNER, M. (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* **19**, 298-310.
- MARTINI, R., ZIELASEK, J., and TOYKA, K.V. (1998). Inherited demyelinating neuropathies: from gene to disease. *Curr Opin Neurol* **11**, 545-556.
- 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.
- MATHEWS, C.E., LANGLEY, S.H., and LEITER, E.H. (2002). New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Transplantation* **73**, 1333-1336.
- MATSUMOTO, T., ONO, Y., KURONO, M., KUROMIYA, A., NAKAMURA, K., and BRIL, V. (2008). Ranirestat (AS-3201), a potent aldose reductase inhibitor, reduces sorbitol levels and improves motor nerve conduction velocity in streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Sci* **107**, 231-237.
- MATSUMOTO, T., ONO, Y., KURONO, M., KUROMIYA, A., NAKAMURA, K., and BRIL, V. (2009). Improvement of motor nerve conduction velocity in diabetic rats requires normalization of the polyol pathway metabolites flux. *J Pharmacol Sci* **109**, 203-210.
- MAUREL, P., and SALZER, J.L. (2000). Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J Neurosci* **20**, 4635-4645.
- 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.
- MCPHEE, S.W., JANSON, C.G., LI, C., SAMULSKI, R.J., CAMP, A.S., FRANCIS, J., SHERA, D., LIOUTERMANN, L., FEELY, M., FREESE, A., and LEONE, P. (2006). Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. *J Gene Med* **8**, 577-588.
- MEI, L., and XIONG, W.C. (2008). Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **9**, 437-452.
- MEIER, C., PARMANTIER, E., BRENNAN, A., MIRSKY, R., and JESSEN, K.R. (1999). Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci* **19**, 3847-3859.
- MEUR, G., SIMON, A., HARUN, N., VIRALLY, M., DECHAUME, A., BONNEFOND, A., FETITA, S., TARASOV, A.I., GUILLAUSSEAU, P.J., BOESGAARD, T.W., PEDERSEN, O.,

- HANSEN, T., POLAK, M., GAUTIER, J.F., FROGUEL, P., RUTTER, G.A., and VAXILLAIRE, M. (2010). Insulin gene mutations resulting in early-onset diabetes: marked differences in clinical presentation, metabolic status, and pathogenic effect through endoplasmic reticulum retention. *Diabetes* **59**, 653-661.
- MEYER, D., YAMAAI, T., GARRATT, A., RIETHMACHER-SONNENBERG, E., KANE, D., THEILL, L.E., and BIRCHMEIER, C. (1997). Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* **124**, 3575-3586.
- MICHAILOV, G.V., SEREDA, M.W., BRINKMANN, B.G., FISCHER, T.M., HAUG, B., BIRCHMEIER, C., ROLE, L., LAI, C., SCHWAB, M.H., and NAVE, K.A. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* **304**, 700-703.
- MILLER, S.D., KARPUS, W.J., and DAVIDSON, T.S. (2010). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 15**, Unit 15 11.
- MINGOZZI, F., MAUS, M.V., HUI, D.J., SABATINO, D.E., MURPHY, S.L., RASKO, J.E., RAGNI, M.V., MANNO, C.S., SOMMER, J., JIANG, H., PIERCE, G.F., ERTL, H.C., and HIGH, K.A. (2007). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* **13**, 419-422.
- MIRSKY, R., WOODHOO, A., PARKINSON, D.B., ARTHUR-FARRAJ, P., BHASKARAN, A., and JESSEN, K.R. (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst* **13**, 122-135.
- MIZISIN, A.P., BACHE, M., DISTEFANO, P.S., ACHESON, A., LINDSAY, R.M., and CALCUTT, N.A. (1997). BDNF attenuates functional and structural disorders in nerves of galactose-fed rats. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 1290-1301.
- MIZISIN, A.P., VU, Y., SHUFF, M., and CALCUTT, N.A. (2004). Ciliary neurotrophic factor improves nerve conduction and ameliorates regeneration deficits in diabetic rats. *Diabetes* **53**, 1807-1812.
- MOALIC, Y., FELIX, H., TAKEUCHI, Y., JESTIN, A., and BLANCHARD, Y. (2009). Genome areas with high gene density and CpG island neighborhood strongly attract porcine endogenous retrovirus for integration and favor the formation of hot spots. *J Virol* **83**, 1920-1929.
- MOCHIZUKI, H., and MIZUNO, Y. (2003). Gene therapy for Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 205-213.
- MOHAMED-ALI, V., and PINKNEY, J. (2002). Therapeutic potential of insulin-like growth factor-1 in patients with diabetes mellitus. *Treat Endocrinol* **1**, 399-410.
- MOHARIC, M., and BURGER, H. (2009). Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on sensation thresholds in patients with painful diabetic neuropathy: an observational study. *Int J Rehabil Res*.
- MOLVEN, A., RINGDAL, M., NORDBO, A.M., RAEDER, H., STOY, J., LIPKIND, G.M., STEINER, D.F., PHILIPSON, L.H., BERGMANN, I., AARSKOG, D., UNDLIEN, D.E., JONER, G., SOVIK, O., BELL, G.I., and NJOLSTAD, P.R. (2008). Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes. *Diabetes* **57**, 1131-1135.
- MORRIONE, A., ROMANO, G., NAVARRO, M., REISS, K., VALENTINIS, B., DEWS, M., EVES, E., ROSNER, M.R., and BASERGA, R. (2000). Insulin-like growth factor I receptor signaling in differentiation of neuronal H19-7 cells. *Cancer Res* **60**, 2263-2272.
- MORRISON, S.J., WHITE, P.M., ZOCK, C., and ANDERSON, D.J. (1999). Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* **96**, 737-749.
- MOSS, R.B., MILLA, C., COLOMBO, J., ACCURSO, F., ZEITLIN, P.L., CLANCY, J.P., SPENCER, L.T., PILEWSKI, J., WALTZ, D.A., DORKIN, H.L., FERKOL, T., PIAN, M., RAMSEY, B., CARTER, B.J., MARTIN, D.B., and HEALD, A.E. (2007). Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther* **18**, 726-732.
- 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

- NAGARAJAN, R., SVAREN, J., LE, N., ARAKI, T., WATSON, M., and MILBRANDT, J. (2001). EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* **30**, 355-368.
- NAKASHIMA, E., POP-BUSUI, R., TOWNS, R., THOMAS, T.P., HOSAKA, Y., NAKAMURA, J., GREENE, D.A., KILLEN, P.D., SCHROEDER, J., LARKIN, D.D., HO, Y.L., and STEVENS, M.J. (2005). Regulation of the human taurine transporter by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells stably transformed to overexpress aldose reductase. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1530-1542.
- NALDINI, L., BLOMER, U., GAGE, F.H., TRONO, D., and VERMA, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11382-11388.
- NAVARRO, X., KENNEDY, W.R., AEPPLI, D., and SUTHERLAND, D.E. (1996). Neuropathy and mortality in diabetes: influence of pancreas transplantation. *Muscle Nerve* **19**, 1009-1016.
- NAVARRO, X., KENNEDY, W.R., and SUTHERLAND, D.E. (1991). Autonomic neuropathy and survival in diabetes mellitus: effects of pancreas transplantation. *Diabetologia* **34 Suppl 1**, S108-112.
- NAVARRO, X., SUTHERLAND, D.E., and KENNEDY, W.R. (1997). Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *Ann Neurol* **42**, 727-736.
- 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.
- NAVE, K.A., and SALZER, J.L. (2006). Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 492-500.
- NEUBERG, D.H., SANCHO, S., and SUTER, U. (1999). Altered molecular architecture of peripheral nerves in mice lacking the peripheral myelin protein 22 or connexin32. *J Neurosci Res* **58**, 612-623.
- NGUYEN, T., MEHTA, N.R., CONANT, K., KIM, K.J., JONES, M., CALABRESI, P.A., MELLI, G., HOKE, A., SCHNAAR, R.L., MING, G.L., SONG, H., KESWANI, S.C., and GRIFFIN, J.W. (2009). Axonal protective effects of the myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci* **29**, 630-637.
- NICKOLS, J.C., VALENTINE, W., KANWAL, S., and CARTER, B.D. (2003). Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci* **6**, 161-167.
- NICHOLSON, S.M., GOMES, D., DE NECHAUD, B., and BRUZZONE, R. (2001). Altered gene expression in Schwann cells of connexin32 knockout animals. *J Neurosci Res* **66**, 23-36.

## O

- O'CONNOR, A.B., and DWORKIN, R.H. (2009). Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am J Med* **122**, S22-32.
- OBROSOVA, I.G. (2009). Diabetes and the peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 931-940.
- OBROSOVA, I.G., DREL, V.R., PACHER, P., ILNYTSKA, O., WANG, Z.Q., STEVENS, M.J., and YOREK, M.A. (2005a). 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., 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.
- OBROSOVA, I.G., MABLEY, J.G., ZSENGELLER, Z., CHARNIAUSKAYA, T., ABATAN, O.I., GROVES, J.T., and SZABO, C. (2005b). Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. *Faseb J* **19**, 401-403.
- OBROSOVA, I.G., XU, W., LYZOGUBOV, V.V., ILNYTSKA, O., MASHTALIR, N., VARENIUK, I., PAVLOV, I.A., ZHANG, J., SLUSHER, B., and DREL, V.R. (2008). PARP inhibition or gene deficiency counteracts intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain in advanced diabetic neuropathy. *Free Radic Biol Med* **44**, 972-981.

- OGATA, T., IJIMA, S., HOSHIKAWA, S., MIURA, T., YAMAMOTO, S., ODA, H., NAKAMURA, K., and TANAKA, S. (2004). Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control Schwann cell myelination. *J Neurosci* **24**, 6724-6732.
- OHNO, M., HIRAOKA, Y., MATSUOKA, T., TOMIMOTO, H., TAKAO, K., MIYAKAWA, T., OSHIMA, N., KIYONARI, H., KIMURA, T., KITA, T., and NISHI, E. (2009). Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* **12**, 1506-1513.
- OHSAWA, M., and KAMEI, J. (1999). Possible involvement of spinal protein kinase C in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* **372**, 221-228.
- OKA, M., and KATO, N. (2001). Aldose reductase inhibitors. *J Enzyme Inhib* **16**, 465-473.
- ORELLANA, J.A., HERNANDEZ, D.E., EZAN, P., VELARDE, V., BENNETT, M.V., GIAUME, C., and SAEZ, J.C. (2010). Hypoxia in high glucose followed by reoxygenation in normal glucose reduces the viability of cortical astrocytes through increased permeability of connexin 43 hemichannels. *Glia* **58**, 329-343.
- OZTURK, G., ERDOGAN, E., OZTURK, M., CENGIZ, N., and HIM, A. (2008). Differential analysis of effect of high glucose level in the development of neuropathy in a tissue culture model of diabetes mellitus: role of hyperosmolality. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **116**, 582-591.

## P

- PACHER, P. (2008). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition as a novel therapeutic approach against intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain associated with advanced diabetic neuropathy: a commentary on "PARP Inhibition or gene deficiency counteracts intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain in advanced diabetic neuropathy". *Free Radic Biol Med* **44**, 969-971.
- PACHER, P., OBROSOVA, I.G., MABLEY, J.G., and SZABO, C. (2005). Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem* **12**, 267-275.
- PACHER, P., and SZABO, C. (2005). Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1568-1580.
- 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, B., FROMHOLT, S.E., HESS, E.J., CRAWFORD, T.O., GRIFFIN, J.W., SHEIKH, K.A., and SCHNAAR, R.L. (2005). Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol* **195**, 208-217.
- PANOUTSOPOULOU, I.G., WENDELSCHAFFER-CRABB, G., HODGES, J.S., and KENNEDY, W.R. (2009). Skin blister and skin biopsy to quantify epidermal nerves: a comparative study. *Neurology* **72**, 1205-1210.
- PAREYSON, D., TARONI, F., BOTTI, S., MORBIN, M., BARATTA, S., LAURIA, G., CIANO, C., and SGHIRLANZONI, A. (2000). Cranial nerve involvement in CMT disease type 1 due to early growth response 2 gene mutation. *Neurology* **54**, 1696-1698.
- PARK, T.S., BAEK, H.S., and PARK, J.H. (2007). Advanced diagnostic methods of small fiber diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract* **77 Suppl 1**, S190-193.
- PASSINI MA, E.A. (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.
- PEDEN, C.S., MANFREDSSON, F.P., REIMSNIDER, S.K., POIRIER, A.E., BURGER, C., MUZYCZKA, N., and MANDEL, R.J. (2009). Striatal readministration of rAAV vectors reveals an immune response against AAV2 capsids that can be circumvented. *Mol Ther* **17**, 524-537.
- PEIRANO, R.I., GOERICH, D.E., RIETHMACHER, D., and WEGNER, M. (2000). Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Mol Cell Biol* **20**, 3198-3209.

- PENG, J., and JORDAN, V.C. (2010). Expression of estrogen receptor alpha with a Tet-off adenoviral system induces G0/G1 cell cycle arrest in SKBr3 breast cancer cells. *Int J Oncol* **36**, 451-458.
- PFAFFL, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- PICKEL, L., MATSUZUKA, T., DOI, C., AYUZAWA, R., MAURYA, D.K., XIE, S.X., BERKLAND, C., and TAMURA, M. (2010). Overexpression of angiotensin II type 2 receptor gene induces cell death in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther* **9**.
- PINKAS-KRAMARSKI, R., SHELLY, M., GUARINO, B.C., WANG, L.M., LYASS, L., ALROY, I., ALIMANDI, M., KUO, A., MOYER, J.D., LAVI, S., EISENSTEIN, M., RATZKIN, B.J., SEGER, R., BACUS, S.S., PIERCE, J.H., ANDREWS, G.C., and YARDEN, Y. (1998). ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Mol Cell Biol* **18**, 6090-6101.
- PITTENGER, G., and VINIK, A. (2003). Nerve growth factor and diabetic neuropathy. *Exp Diabetes Res* **4**, 271-285.
- POLIAK, S., and PELES, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* **4**, 968-980.
- POPKO, B. (2003). Myelin: not just a conduit for conduction. *Nat Genet* **33**, 327-328.
- PORSTMANN, T., GRIFFITHS, B., CHUNG, Y.L., DELPUECH, O., GRIFFITHS, J.R., DOWNWARD, J., and SCHULZE, A. (2005). PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **24**, 6465-6481.

## Q

- QUARLES, R.H. (2009). A hypothesis about the relationship of myelin-associated glycoprotein's function in myelinated axons to its capacity to inhibit neurite outgrowth. *Neurochem Res* **34**, 79-86.
- QUINTES, S., GOEBBELS, S., SAHER, G., SCHWAB, M.H., and NAVE, K.A. (2010). Neuron-glia signaling and the protection of axon function by Schwann cells. *J Peripher Nerv Syst* **15**, 10-16.

## R

- RANS, T.S., and ENGLAND, R. (2009). The evolution of gene therapy in X-linked severe combined immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* **102**, 357-362; quiz 363-355, 402.
- RAUCK, R.L., SHAIBANI, A., BITON, V., SIMPSON, J., and KOCH, B. (2007). Lacosamide in painful diabetic peripheral neuropathy: a phase 2 double-blind placebo-controlled study. *Clin J Pain* **23**, 150-158.
- RAZAVI, R., CHAN, Y., AFIFIYAN, F.N., LIU, X.J., WAN, X., YANTHA, J., TSUI, H., TANG, L., TSAI, S., SANTAMARIA, P., DRIVER, J.P., SERREZE, D., SALTER, M.W., and DOSCH, H.M. (2006). TRPV1+ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell* **127**, 1123-1135.
- RELPH, K.L., HARRINGTON, K.J., and PANDHA, H. (2005). Adenoviral strategies for the gene therapy of cancer. *Semin Oncol* **32**, 573-582.
- RESSOT, C., GOMES, D., DAUTIGNY, A., PHAM-DINH, D., and BRUZZONE, R. (1998). Connexin32 mutations associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease show two distinct behaviors: loss of function and altered gating properties. *J Neurosci* **18**, 4063-4075.
- RIND, H.B., and VON BARTHELD, C.S. (2002). Target-derived cardiotrophin-1 and insulin-like growth factor-I promote neurite growth and survival of developing oculomotor neurons. *Mol Cell Neurosci* **19**, 58-71.
- 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.
- ROMANO, G.E.A. (2000). Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* **18**, 19-39.
- RON, D. (2002). Proteotoxicity in the endoplasmic reticulum: lessons from the Akita diabetic mouse. *J Clin Invest* **109**, 443-445.

- ROY, K., MURTIE, J.C., EL-KHODOR, B.F., EDGAR, N., SARDI, S.P., HOOKS, B.M., BENOIT-MARAND, M., CHEN, C., MOORE, H., O'DONNELL, P., BRUNNER, D., and CORFAS, G. (2007). Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8131-8136.
- RUDOLPH, C., PLANK, C., LAUSIER, J., SCHILLINGER, U., MULLER, R.H., and ROSENECKER, J. (2003). Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J Biol Chem* **278**, 11411-11418.
- RUSHTON, W.A. (1951). A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J Physiol* **115**, 101-122.
- RYU, E.J., WANG, J.Y., LE, N., BALOH, R.H., GUSTIN, J.A., SCHMIDT, R.E., and MILBRANDT, J. (2007). Misexpression of Pou3f1 results in peripheral nerve hypomyelination and axonal loss. *J Neurosci* **27**, 11552-11559.
- RYU, E.J., YANG, M., GUSTIN, J.A., CHANG, L.W., FREIMUTH, R.R., NAGARAJAN, R., and MILBRANDT, J. (2008). Analysis of peripheral nerve expression profiles identifies a novel myelin glycoprotein, MP11. *J Neurosci* **28**, 7563-7573.

## S

- SABATINO, D.E., MACKENZIE, T.C., PERANTEAU, W., EDMONSON, S., CAMPAGNOLI, C., LIU, Y.L., FLAKE, A.W., and HIGH, K.A. (2007). Persistent expression of hF.IX After tolerance induction by in utero or neonatal administration of AAV-1-F.IX in hemophilia B mice. *Mol Ther* **15**, 1677-1685.
- SAMSAM, M., FREI, R., MARZINIAK, M., MARTINI, R., and SOMMER, C. (2002). Impaired sensory function in heterozygous P0 knockout mice is associated with nodal changes in sensory nerves. *J Neurosci Res* **67**, 167-173.
- SANCHO, S., YOUNG, P., and SUTER, U. (2001). Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* **124**, 2177-2187.
- SANGO, K., HORIE, H., SAITO, H., AJIKI, K., TOKASHIKI, A., TAKESHITA, K., ISHIGATSUBO, Y., KAWANO, H., and ISHIKAWA, Y. (2002). Diabetes is not a potent inducer of neuronal cell death in mouse sensory ganglia, but it enhances neurite regeneration in vitro. *Life Sci* **71**, 2351-2368.
- SARGIANNIDOU, I., VAVLITOU, N., ARISTODEMOU, S., HADJISAVVAS, A., KYRIACOU, K., SCHERER, S.S., and KLEOPA, K.A. (2009). Connexin32 mutations cause loss of function in Schwann cells and oligodendrocytes leading to PNS and CNS myelination defects. *J Neurosci* **29**, 4736-4749.
- SASAGASAKO, N., TODA, K., HOLLIS, M., and QUARLES, R.H. (1996). Myelin gene expression in immortalized Schwann cells: relationship to cell density and proliferation. *J Neurochem* **66**, 1432-1439.
- SCHACHNER, M., and BARTSCH, U. (2000). Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* **29**, 154-165.
- SCHEMMELE, K.E., PADIYARA, R.S., and D'SOUZA, J.J. (2009). Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. *J Diabetes Complications*.
- SCHERER, S.S., BONE, L.J., DESCHENES, S.M., ABEL, A., BALICE-GORDON, R.J., and FISCHBECK, K.H. (1999). The role of the gap junction protein connexin32 in the pathogenesis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Novartis Found Symp* **219**, 175-185; discussion 185-177.
- SCHERER, S.S., DESCHENES, S.M., XU, Y.T., GRINSPAN, J.B., FISCHBECK, K.H., and PAUL, D.L. (1995). Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* **15**, 8281-8294.
- SCHERER, S.S., and WRABETZ, L. (2008). Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. *Glia* **56**, 1578-1589.
- 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.

- SCHMIDT, R.E., GREEN, K.G., SNIPES, L.L., and FENG, D. (2009). Neuritic dystrophy and neuropathy in Akita (Ins2(Akita)) diabetic mouse sympathetic ganglia. *Exp Neurol* **216**, 207-218.
- SCHMUCKER, J., ADER, M., BROCKSCHNIEDER, D., BRODARAC, A., BARTSCH, U., and RIETHMACHER, D. (2003). erbB3 is dispensable for oligodendrocyte development in vitro and in vivo. *Glia* **44**, 67-75.
- SCHNAAR, R.L., and LOPEZ, P.H. (2009). Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J Neurosci Res* **87**, 3267-3276.
- 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.
- SCHREINER, S., COSSAIS, F., FISCHER, K., SCHOLZ, S., BOSL, M.R., HOLTMANN, B., SENDTNER, M., and WEGNER, M. (2007). Hypomorphic Sox10 alleles reveal novel protein functions and unravel developmental differences in glial lineages. *Development* **134**, 3271-3281.
- SHAIBANI, A., FARES, S., SELAM, J.L., ARSLANIAN, A., SIMPSON, J., SEN, D., and BONGARDT, S. (2009). Lacosamide in painful diabetic neuropathy: an 18-week double-blind placebo-controlled trial. *J Pain* **10**, 818-828.
- SHANGGUAN, Y., HALL, K.E., NEUBIG, R.R., and WILEY, J.W. (2003). Diabetic neuropathy: inhibitory G protein dysfunction involves PKC-dependent phosphorylation of G $\alpha$ . *J Neurochem* **86**, 1006-1014.
- SHARMA, S.S., KUMAR, A., and KAUNDAL, R.K. (2008). Protective effects of 4-amino-1,8-naphthalimide, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci* **82**, 570-576.
- 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.
- SHEN-ORR, S.S., MILO, R., MANGAN, S., and ALON, U. (2002). Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nat Genet* **31**, 64-68.
- SHEVTSOVA Z, E.A. (2005). Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo. *Exp Physiol* **90**, 53-59.
- SHIMOSHIGE, Y., ENOMOTO, R., AOKI, T., MATSUOKA, N., and KANEKO, S. (2010). The involvement of aldose reductase in alterations to neurotrophin receptors and neuronal cytoskeletal protein mRNA levels in the dorsal root ganglion of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull* **33**, 67-71.
- SHIMOSHIGE, Y., MINOURA, K., MATSUOKA, N., TAKAKURA, S., MUTOH, S., and KAMIJO, M. (2009). Thirteen-month inhibition of aldose reductase by zenarestat prevents morphological abnormalities in the dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res* **1247**, 182-187.
- SIMA, A.A. (2004). Diabetic neuropathy in type 1 and type 2 diabetes and the effects of C-peptide. *J Neurol Sci* **220**, 133-136.
- SIMA, A.A., and KAMIYA, H. (2008). Is C-peptide replacement the missing link for successful treatment of neurological complications in type 1 diabetes? *Curr Drug Targets* **9**, 37-46.
- SIMA, A.A., ZHANG, W., LI, Z.G., MURAKAWA, Y., and PIERSON, C.R. (2004). Molecular alterations underlie nodal and paranodal degeneration in type 1 diabetic neuropathy and are prevented by C-peptide. *Diabetes* **53**, 1556-1563.
- SIMA, A.A., ZHANG, W., XU, G., SUGIMOTO, K., GUBERSKI, D., and YOREK, M.A. (2000). A comparison of diabetic polyneuropathy in type II diabetic BBZDR/Wor rats and in type I diabetic BB/Wor rats. *Diabetologia* **43**, 786-793.
- SINGH, H., and JUNGALWALA, F.B. (1979). The turnover of myelin proteins in adult rat brain. *Int J Neurosci* **9**, 123-131.
- SINHA, S., and LIEBERBURG, I. (1999). Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11049-11053.
- SLEEMAN, M.W., ANDERSON, K.D., LAMBERT, P.D., YANCOPOULOS, G.D., and WIEGAND, S.J. (2000). The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* **74**, 265-272.
- SLUKA, K.A., and AUDETTE, K.M. (2006). Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia. *Mol Pain* **2**, 13.

- SOBUE, G., YAMAMOTO, M., DOYU, M., LI, M., YASUDA, T., and MITSUMA, T. (1998). Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75NGFR, trk, trkB, and trkC) in human peripheral neuropathies. *Neurochem Res* **23**, 821-829.
- SOMMER, L. (2001). Context-dependent regulation of fate decisions in multipotent progenitor cells of the peripheral nervous system. *Cell Tissue Res* **305**, 211-216.
- SONG, S., EMBURY, J., LAIPIS, P.J., BERNS, K.I., CRAWFORD, J.M., and FLOTTE, T.R. (2001). Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* **8**, 1299-1306.
- SONG, Z., FU, D.T., CHAN, Y.S., LEUNG, S., CHUNG, S.S., and CHUNG, S.K. (2003). Transgenic mice overexpressing aldose reductase in Schwann cells show more severe nerve conduction velocity deficit and oxidative stress under hyperglycemic stress. *Mol Cell Neurosci* **23**, 638-647.
- SOUAYAH, N., and TICK CHONG, P.S. (2010). Asymmetric phenotype associated with rare myelin protein zero mutation. *J Clin Neuromuscul Dis* **11**, 110-113.
- SOUNDARA MANICKAM, D., BISHT, H.S., WAN, L., MAO, G., and OUPICKY, D. (2005). Influence of TAT-peptide polymerization on properties and transfection activity of TAT/DNA polyplexes. *J Control Release* **102**, 293-306.
- SRINIVASAN, R., JANG, S.W., WARD, R.M., SACHDEV, S., EZASHI, T., and SVAREN, J. (2007). Differential regulation of NAB corepressor genes in Schwann cells. *BMC Mol Biol* **8**, 117.
- STANGLER HERODEZ, S., ZAGRADISNIK, B., ERJAVEC SKERGET, A., ZAGORAC, A., and KOKALJ VOKAC, N. (2009). Molecular diagnosis of PMP22 gene duplications and deletions: comparison of different methods. *J Int Med Res* **37**, 1626-1631.
- STAUGAITIS, S.M., COLMAN, D.R., and PEDRAZA, L. (1996). Membrane adhesion and other functions for the myelin basic proteins. *Bioessays* **18**, 13-18.
- STEFANSSON, H., SIGURDSSON, E., STEINTHORSDOTTIR, V., BJORNSDOTTIR, S., SIGMUNDSSON, T., GHOSH, S., BRYNJOLFSSON, J., GUNNARSDOTTIR, S., IVARSSON, O., CHOU, T.T., HJALTASON, O., BIRGISDOTTIR, B., JONSSON, H., GUDNADOTTIR, V.G., GUDMUNDSDOTTIR, E., BJORNSSON, A., INGVARSSON, B., INGASON, A., SIGFUSSON, S., HARDARDOTTIR, H., HARVEY, R.P., LAI, D., ZHOU, M., BRUNNER, D., MUTEL, V., GONZALO, A., LEMKE, G., SAINZ, J., JOHANNESSON, G., ANDRESSON, T., GUDBJARTSSON, D., MANOLESCU, A., FRIGGE, M.L., GURNEY, M.E., KONG, A., GULCHER, J.R., PETURSSON, H., and STEFANSSON, K. (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* **71**, 877-892.
- STEVENS, M.J., LI, F., DREL, V.R., ABATAN, O.I., KIM, H., BURNETT, D., LARKIN, D., and OBROSOVA, I.G. (2007). Nicotinamide reverses neurological and neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 458-464.
- STEVENS, M.J., ZHANG, W., LI, F., and SIMA, A.A. (2004). C-peptide corrects endoneurial blood flow but not oxidative stress in type 1 BB/Wor rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E497-505.
- 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., YASUJIMA, M., and YAGIHASHI, S. (2008). Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des* **14**, 953-961.
- 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.
- SURACE, E.M., and AURICCHIO, A. (2008). Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer. *Vision Res* **48**, 353-359.
- SUSSMAN, C.R., VARTANIAN, T., and MILLER, R.H. (2005). The ErbB4 neuregulin receptor mediates suppression of oligodendrocyte maturation. *J Neurosci* **25**, 5757-5762.

- SVAREN, J., SEVETSON, B.R., APEL, E.D., ZIMONJIC, D.B., POPESCU, N.C., and MILBRANDT, J. (1996). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* **16**, 3545-3553.
- SVAREN, J., SEVETSON, B.R., GOLDA, T., STANTON, J.J., SWIRNOFF, A.H., and MILBRANDT, J. (1998). Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by Egr transactivators. *Embo J* **17**, 6010-6019.
- SWIERS, G., PATIENT, R., and LOOSE, M. (2006). Genetic regulatory networks programming hematopoietic stem cells and erythroid lineage specification. *Dev Biol* **294**, 525-540.
- SWISLOCKI, A., ORTH, M., BALES, M., WEISSHAUPT, J., WEST, C., EDRINGTON, J., COOPER, B., SAPUTO, L., ISLAS, M., and MIASKOWSKI, C. (2010). A randomized clinical trial of the effectiveness of photon stimulation on pain, sensation, and quality of life in patients with diabetic peripheral neuropathy. *J Pain Symptom Manage* **39**, 88-99.
- SYED, N., REDDY, K., YANG, D.P., TAVEGGIA, C., SALZER, J.L., MAUREL, P., and KIM, H.A. (2010). Soluble neuregulin-1 has bifunctional, concentration-dependent effects on schwann cell myelination. *J Neurosci* **30**, 6122-6131.
- SZABO, C. (2005). Roles of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Pharmacol Res* **52**, 60-71.

## T

- TAKESHI S, E.A. (1999). Characterization of polyol pathway in schwann cells isolated from adult rat sciatic nerves. *J Neurosci Res* **57**, 495-503.
- TALMUD, P.J., HINGORANI, A.D., COOPER, J.A., MARMOT, M.G., BRUNNER, E.J., KUMARI, M., KIVIMAKI, M., and HUMPHRIES, S.E. (2010). Utility of genetic and non-genetic risk factors in prediction of type 2 diabetes: Whitehall II prospective cohort study. *Bmj* **340**, b4838.
- TANG, Y., WU, H., UGAI, H., MATTHEWS, Q.L., and CURIEL, D.T. (2009). Derivation of a triple mosaic adenovirus for cancer gene therapy. *PLoS One* **4**, e8526.
- TAO, Y., DAI, P., LIU, Y., MARCHETTO, S., XIONG, W.C., BORG, J.P., and MEI, L. (2009). Erbin regulates NRG1 signaling and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9477-9482.
- TAVEGGIA, C., PIZZAGALLI, A., FAGIANI, E., MESSING, A., FELTRI, M.L., and WRABETZ, L. (2004). Characterization of a Schwann cell enhancer in the myelin basic protein gene. *J Neurochem* **91**, 813-824.
- TAVEGGIA, C., THAKER, P., PETRYLAK, A., CAPORASO, G.L., TOEWS, A., FALLS, D.L., EINHEBER, S., and SALZER, J.L. (2008). Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination. *Glia* **56**, 284-293.
- TAVEGGIA, C., ZANAZZI, G., PETRYLAK, A., YANO, H., ROSENBLUTH, J., EINHEBER, S., XU, X., ESPER, R.M., LOEB, J.A., SHRAGER, P., CHAO, M.V., FALLS, D.L., ROLE, L., and SALZER, J.L. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* **47**, 681-694.
- 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, E.A. (2000). Tropism of AAV-2 vectors for neurons of the globus pallidus. *Neuroreport* **11**, 2277-2283.
- THOMAS, T.P., FELDMAN, E.L., NAKAMURA, J., KATO, K., LIEN, M., STEVENS, M.J., and GREENE, D.A. (1993). Ambient glucose and aldose reductase-induced myo-inositol depletion modulate basal and carbachol-stimulated inositol phospholipid metabolism and diacylglycerol accumulation in human retinal pigment epithelial cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9712-9716.
- THRAILKILL, K.M. (2000). Insulin-like growth factor-I in diabetes mellitus: its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility. *Diabetes Technol Ther* **2**, 69-80.
- TIMMERMAN, V., DE JONGHE, P., CEUTERICK, C., DE VRIENDT, E., LOFGREN, A., NELIS, E., WARNER, L.E., LUPSKI, J.R., MARTIN, J.J., and VAN BROECKHOVEN, C. (1999). Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine-Sottas syndrome phenotype. *Neurology* **52**, 1827-1832.

- TOMITA, K., KUBO, T., MATSUDA, K., YANO, K., TOHYAMA, M., and HOSOKAWA, K. (2007). Myelin-associated glycoprotein reduces axonal branching and enhances functional recovery after sciatic nerve transection in rats. *Glia* **55**, 1498-1507.
- TOMLINSON, D.R. (1992). The pharmacology of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Rev* **8**, 67-84.
- TOMPA, P. (2005). The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett* **579**, 3346-3354.
- TOPIILKO, P., SCHNEIDER-MAUNOURY, S., LEVI, G., BARON-VAN EVERCOOREN, A., CHENNOUFI, A.B., SEITANIDOU, T., BABINET, C., and CHARNAY, P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* **371**, 796-799.
- TOSAKI, T., KAMIYA, H., YASUDA, Y., NARUSE, K., KATO, K., KOZAKAE, M., NAKAMURA, N., SHIBATA, T., HAMADA, Y., NAKASHIMA, E., OISO, Y., and NAKAMURA, J. (2008). Reduced NGF secretion by Schwann cells under the high glucose condition decreases neurite outgrowth of DRG neurons. *Exp Neurol* **213**, 381-387.
- TOTH, C., MARTINEZ, J., and ZOCHODNE, D.W. (2007). RAGE, diabetes, and the nervous system. *Curr Mol Med* **7**, 766-776.
- 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., 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

- UEHARA, K., YAMAGISHI, S., OTSUKI, S., CHIN, S., and YAGIHASHI, S. (2004). Effects of polyol pathway hyperactivity on protein kinase C activity, nociceptive peptide expression, and neuronal structure in dorsal root ganglia in diabetic mice. *Diabetes* **53**, 3239-3247.
- ULZHEIMER, J.C., PELES, E., LEVINSON, S.R., and MARTINI, R. (2004). Altered expression of ion channel isoforms at the node of Ranvier in P0-deficient myelin mutants. *Mol Cell Neurosci* **25**, 83-94.

## V

- VALLIANOU, N., EVANGELOPOULOS, A., and KOUTALAS, P. (2009). Alpha-lipoic Acid and diabetic neuropathy. *Rev Diabet Stud* **6**, 230-236.
- VAN DER WERF, N., KROESE, F.G., ROZING, J., and HILLEBRANDS, J.L. (2007). Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **23**, 169-183.
- VAN VLIET, K., BLOUIN, V., AGBANDJE-MCKENNA, M., and SNYDER, R.O. (2006). Proteolytic mapping of the adeno-associated virus capsid. *Mol Ther* **14**, 809-821.
- VANDENBERGHE, L.H., WILSON, J.M., and GAO, G. (2009). Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy. *Gene Ther* **16**, 311-319.
- VANDENDRIESCHE, T., THORREZ, L., ACOSTA-SANCHEZ, A., PETRUS, I., WANG, L., MA, L., L, D.E.W., IWASAKI, Y., GILLIJNS, V., WILSON, J.M., COLLEN, D., and CHUAH, M.K. (2007). Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *J Thromb Haemost* **5**, 16-24.
- VARENIUK, I., PAVLOV, I.A., DREL, V.R., LYZOGUBOV, V.V., ILNYTSKA, O., BELL, S.R., TIBREWALA, J., GROVES, J.T., and OBROSOVA, I.G. (2007). Nitrosative stress and peripheral diabetic neuropathy in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Exp Neurol* **205**, 425-436.
- VARKONYI, T., and KEMPLER, P. (2008). Diabetic neuropathy: new strategies for treatment. *Diabetes Obes Metab* **10**, 99-108.
- VASSAR, R., BENNETT, B.D., BABU-KHAN, S., KAHN, S., MENDIAZ, E.A., DENIS, P., TEPLow, D.B., ROSS, S., AMARANTE, P., LOELOFF, R., LUO, Y., FISHER, S., FULLER, J., EDENSON, S., LILE, J., JAROSINSKI, M.A., BIERE, A.L., CURRAN, E., BURGESS, T., LOUIS, J.C., COLLINS, F., TREANOR, J., ROGERS, G., and CITRON,

- M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-741.
- 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.
- VINCENT, A.M., HAYES, J.M., MCLEAN, L.L., VIVEKANANDAN-GIRI, A., PENNATHUR, S., and FELDMAN, E.L. (2009a). Dyslipidemia-induced neuropathy in mice: the role of oxLDL/LOX-1. *Diabetes* **58**, 2376-2385.
- VINCENT, A.M., HINDER, L.M., POP-BUSUI, R., and FELDMAN, E.L. (2009b). Hyperlipidemia: a new therapeutic target for diabetic neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* **14**, 257-267.
- VINCENT, A.M., KATO, K., MCLEAN, L.L., SOULES, M.E., and FELDMAN, E.L. (2009c). Sensory neurons and schwann cells respond to oxidative stress by increasing antioxidant defense mechanisms. *Antioxid Redox Signal* **11**, 425-438.
- VINCENT, A.M., RUSSELL, J.W., SULLIVAN, K.A., BACKUS, C., HAYES, J.M., MCLEAN, L.L., and FELDMAN, E.L. (2007). SOD2 protects neurons from injury in cell culture and animal models of diabetic neuropathy. *Exp Neurol* **208**, 216-227.

## W

- 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, H., ALLEN, M.L., GRIGG, J.J., NOBELS, J.L., and TEMPEL, B.L. (1995). Hypomyelination alters K<sup>+</sup> channel expression in mouse mutants shiverer and Trembler. *Neuron* **15**, 1337-1347.
- WANG, Y., MA, L., WANG, S., BAO, Y., NI, C., GUAN, N., ZHAO, J., and FAN, X. (2009). Assessment of CAR- or CD46-dependent adenoviral vector-mediated TRAIL gene therapy in clinical adenocarcinoma lung cancer cells. *Oncology* **77**, 366-377.
- 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., KUHR, C.S., ALLEN, J.M., BLANKINSHIP, M., GREGOREVIC, P., CHAMBERLAIN, J.S., TAPSCOTT, S.J., and STORB, R. (2007). Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther* **15**, 1160-1166.
- WARNER, L.E., MANCIAS, P., BUTLER, I.J., MCDONALD, C.M., KEPPEL, L., KOOB, K.G., and LUPSKI, J.R. (1998). Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* **18**, 382-384.
- WARNER, L.E., SVAREN, J., MILBRANDT, J., and LUPSKI, J.R. (1999). Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* **8**, 1245-1251.
- WHITE, F.A., BHANGOO, S.K., and MILLER, R.J. (2005). Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 834-844.
- WIGGIN, T.D., SULLIVAN, K.A., POP-BUSUI, R., AMATO, A., SIMA, A.A., and FELDMAN, E.L. (2009). Elevated triglycerides correlate with progression of diabetic neuropathy. *Diabetes* **58**, 1634-1640.
- WILSON, D.R. (2002). Viral-mediated gene transfer for cancer treatment. *Curr Pharm Biotechnol* **3**, 151-164.
- WILLECKE, K., KIRCHHOFF, S., PLUM, A., TEMME, A., THONNISSEN, E., and OTT, T. (1999). Biological functions of connexin genes revealed by human genetic defects, dominant negative approaches and targeted deletions in the mouse. *Novartis Found Symp* **219**, 76-88; discussion 88-96.
- WILLEM, M., GARRATT, A.N., NOVAK, B., CITRON, M., KAUFMANN, S., RITTGER, A., DESTROOPER, B., SAFTIG, P., BIRCHMEIER, C., and HAASS, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* **314**, 664-666.
- WOODHOO, A., DEAN, C.H., DROGGITI, A., MIRSKY, R., and JESSEN, K.R. (2004). The trunk neural crest and its early glial derivatives: a study of survival responses, developmental schedules and autocrine mechanisms. *Mol Cell Neurosci* **25**, 30-41.
- WOODHOO, A., and SOMMER, L. (2008). Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* **56**, 1481-1490.

- 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.
- WU, C., and LU, Y. (2010). High-titer retroviral vector system for efficient gene delivery into human and mouse cells of hematopoietic and lymphocytic lineages. *J Gen Virol*.
- WU Z, A.A., SAMULSKI R.J. (2006). Adeno-associated Virus Serotypes. *Mol Ther*.
- WYMER, J.P., SIMPSON, J., SEN, D., and BONGARDT, S. (2009). Efficacy and safety of lacosamide in diabetic neuropathic pain: an 18-week double-blind placebo-controlled trial of fixed-dose regimens. *Clin J Pain* **25**, 376-385.

## X

- XU, Y.E.A. (2005). A combination of mutations enhances the neurotropism of AAV-2. *Virology* **341**, 203-214.

## Y

- 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.
- YAMAMOTO, M., MITSUMA, N., ITO, Y., HATTORI, N., NAGAMATSU, M., LI, M., MITSUMA, T., and SOBUE, G. (1998). Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and GDNFR-alpha mRNAs in human peripheral neuropathies. *Brain Res* **809**, 175-181.
- YANG, C.Z., ZHAO, R., DONG, Y., CHEN, X.Q., and YU, A.C. (2008). Astrocyte and neuron intone through glutamate. *Neurochem Res* **33**, 2480-2486.
- YARDEN, Y., and SLIWKOWSKI, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-137.
- YIN, X., KIDD, G.J., NAVE, K.A., and TRAPP, B.D. (2008). P0 protein is required for and can induce formation of schmidt-lantermann incisures in myelin internodes. *J Neurosci* **28**, 7068-7073.
- YIU, G., and HE, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* **7**, 617-627.
- YOON, C., KORADE, Z., and CARTER, B.D. (2008). Protein kinase A-induced phosphorylation of the p65 subunit of nuclear factor-kappaB promotes Schwann cell differentiation into a myelinating phenotype. *J Neurosci* **28**, 3738-3746.
- YOSHIMURA, T., SATAKE, M., and KOBAYASHI, T. (1996). Connexin43 is another gap junction protein in the peripheral nervous system. *J Neurochem* **67**, 1252-1258.
- YOSHIOKA, M., KAYO, T., IKEDA, T., and KOIZUMI, A. (1997). A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* **46**, 887-894.
- YU, C., ROUEN, S., and DOBROWSKY, R.T. (2008). Hyperglycemia and downregulation of caveolin-1 enhance neuregulin-induced demyelination. *Glia* **56**, 877-887.

## Z

- ZALA, D., BENCHOUA, A., BROUILLET, E., PERRIN, V., GAILLARD, M.C., ZURN, A.D., AEBISCHER, P., and DEGLON, N. (2005). Progressive and selective striatal degeneration in primary neuronal cultures using lentiviral vector coding for a mutant huntingtin fragment. *Neurobiol Dis* **20**, 785-798.
- ZANAZZI, G., EINHEBER, S., WESTREICH, R., HANNOCKS, M.J., BEDELL-HOGAN, D., MARCHIONNI, M.A., and SALZER, J.L. (2001). Glial growth factor/neuregulin inhibits Schwann cell myelination and induces demyelination. *J Cell Biol* **152**, 1289-1299.
- ZARUBA, R.A., EPSTEIN, P.N., and CARR, P.A. (2007). Hyperglycemia alters enzyme activity and cell number in spinal sensory ganglia. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* **2**, 11.

- ZHANG, L., YU, C., VASQUEZ, F.E., GALEVA, N., ONYANGO, I., SWERDLOW, R.H., and DOBROWSKY, R.T. (2010). Hyperglycemia alters the schwann cell mitochondrial proteome and decreases coupled respiration in the absence of superoxide production. *J Proteome Res* **9**, 458-471.
- ZHANG, W., KAMIYA, H., EKBERG, K., WAHREN, J., and SIMA, A.A. (2007). C-peptide improves neuropathy in type 1 diabetic BB/Wor-rats. *Diabetes Metab Res Rev* **23**, 63-70.
- 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.
- ZHENG, W.H., KAR, S., and QUIRION, R. (2002). Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* **62**, 225-233.
- ZHEREBITSKAYA, E., AKUDE, E., SMITH, D.R., and FERNYHOUGH, P. (2009). Development of selective axonopathy in adult sensory neurons isolated from diabetic rats: role of glucose-induced oxidative stress. *Diabetes* **58**, 1356-1364.
- ZIEGLER, D., HIDVEGI, T., GURIEVA, I., BONGARDT, S., FREYNHAGEN, R., SEN, D., and SOMMERVILLE, K. (2010). Efficacy and Safety of Lacosamide in Painful Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*.
- ZOLOTUKHIN, S., BYRNE, B.J., MASON, E., ZOLOTUKHIN, I., POTTER, M., CHESNUT, K., SUMMERFORD, C., SAMULSKI, R.J., and MUZYCZKA, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* **6**, 973-985.
- ZSCHUNTZSCH, J., DIBAJ, P., PILGRAM, S., KOTTING, J., GERDING, W.M., and NEUSCH, C. (2009). Severe demyelinating hypertrophic polyneuropathy caused by a de novo frameshift mutation within the intracellular domain of myelin protein zero (MPZ/P0). *J Neurol Sci* **281**, 113-115.



***ANEXO***



## **ANEXO 1. Artículo enviado a Gene Therapy**

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

Judit Homs<sup>1,2</sup>, Lorena Ariza<sup>1,2</sup>, Esther Udina<sup>3,4</sup>, Xavier Navarro<sup>3,4</sup>, Miguel Chillón<sup>1,2,5</sup> and Assumpció Bosch<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy (CBATEG),

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology,

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

<sup>4</sup>CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III

<sup>5</sup>Institut 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.<sup>1</sup> 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.<sup>3-6</sup> 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.<sup>7</sup> On the other hand, initial studies reported that VSV-pseudotyped lentiviral vectors transduced mainly neurons in the central nervous system (CNS).<sup>8</sup> However, more recent works described the ability of different pseudotypes of lentiviruses to also infect glial cells.<sup>9-11</sup> Among them, transduction of mouse and human Schwann cells has been achieved *in vitro*<sup>12</sup> and *in vivo* in animal models of peripheral nerve trauma.<sup>13,14</sup> 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 ( $1.8 \times 10^9$  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  $7.45 \pm 1.5$  % for AAV2/1,  $3.81 \pm 1.35$  % for AAV2 and only  $0.51 \pm 0.40$  % for AAV8. In addition, AAV1- and AAV8-treated DRG contained GFP-expressing cells that were not labelled 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.<sup>15</sup> We performed intrasciatic injections using  $8 \times 10^6$  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.<sup>16</sup> To determine the stability of expression mediated by AAV1 or AAV8 vectors in Schwann cells, we administered  $2.2 \times 10^9$  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,  $\beta$ 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  $1.5 \times 10^9$  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  $\approx 12$ -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.<sup>17</sup> 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.<sup>18</sup> 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  $3.6 \times 10^9$  vg of AAV1 or AAV8CMVLacZ into the sciatic nerve of mice that had undergone nerve crush.  $\beta$ -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,  $4.5 \times 10^9$  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.<sup>20</sup> 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.<sup>21,22</sup> 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,<sup>23</sup> however, CNTF fails to promote myelination *in vivo*.<sup>24</sup> 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,  $\alpha$ -ret, is located mainly in neurons, where CNTF has a paracrine effect promoting cell survival and axonal growth.<sup>12</sup> Wild-type CNTF protein lacks the secretion signal sequence.<sup>25</sup> To stimulate secretion, many groups have engineered CNTF constructs by adding signal sequences from various secreted proteins.<sup>12,26</sup> 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 mice<sup>27</sup> or dose dependent deleterious effects of secreted CNTF in a mouse model of retinal degeneration.<sup>28</sup> 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*.<sup>30,31</sup>

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.<sup>5</sup> 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  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidase protein into the nuclei of the producing cells, when expression is strong enough, some  $\beta$ -galactosidase leakage could be found on the cytoplasm and axons of the producing cells. In this case, the  $\beta$ -gal activity detected in the sciatic nerves transduced with AAV1 may be due to both neuronal and Schwann cell expression, while  $\beta$ -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.

## **MATERIALS 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  $\beta$ -actin promoter and the enhancer of CMV (CAG). The woodchuck hepatitis virus responsive element (WPRE) was added at 3' to stabilize mRNA expression.<sup>32</sup>

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 described<sup>33</sup> 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.<sup>34</sup> Vectors were purified by CsCl or iodixanol gradients.<sup>33</sup> 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- $\mu$ 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.<sup>49</sup> Three  $\mu$ 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.<sup>35,36</sup> 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.<sup>35,36</sup>

**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 x 10<sup>6</sup> vg; AAV2 2.24 x 10<sup>6</sup> vg; AAV8 1.54 x 10<sup>8</sup> vg or 3.07 x 10<sup>7</sup> 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: ATGGATACAAAAGGGTCTGGC; r36B4Rv830: AGCCGCAAATGCAGATGGATC; m36B4Fwd718: ATGGGTACAAGCGCGTCCTG; m36B4Rv830: AGCCCGCAAATGCAGATGGATC; mCNTF-Fwd: GACCTGACTGCTCTTATGGAATC; mCNTF-Rv: GCCTCAGTCATCTCACTCCAG; mGAP-43Fwd: AGCCTAAACAAGCCGATGTGCC; mGAP-43Rv: TTCGTCTACAGCGTCTTTCTCTCTCC; 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.<sup>37</sup>

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; CMVAAV2-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/μl salmon's sperm DNA (Sigma) and assuming that 1 μg of mouse genomic DNA contains  $3 \times 10^5$  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.

## 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  $\pm$  SEM). Statistical analysis: students *t* test with  $p < 0.01$  comparing AAV8 and AAV2 (§);  $p < 0.001$  between AAV8 and AAV1 (#). Scale bar, 130  $\mu$ m.

**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  $\mu$ m in first column; 80  $\mu$ m in last column.

**Fig. 3: Long-term expression in sciatic nerves. A.**

$\beta$ -Galactosidase activity/ $\mu$ g 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 ( $\nu$ ; n = 4), AAV2 ( $\square$ ; n=4), AAV8 ( $\sigma$ ; 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  $\beta$ -galactosidase expression in injured sciatic nerves injected with AAV1 ( $\nu$ ) and AAV8 ( $\Delta$ ) 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  $\mu\text{m}$ . **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).

## 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**

<i>Target / Parameter</i>	17 dpi		24 dpi		30 dpi	
	<b>+GFP</b>	<b>+CNTF</b>	<b>+GFP</b>	<b>+CNTF</b>	<b>+GFP</b>	<b>+CNTF</b>
<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

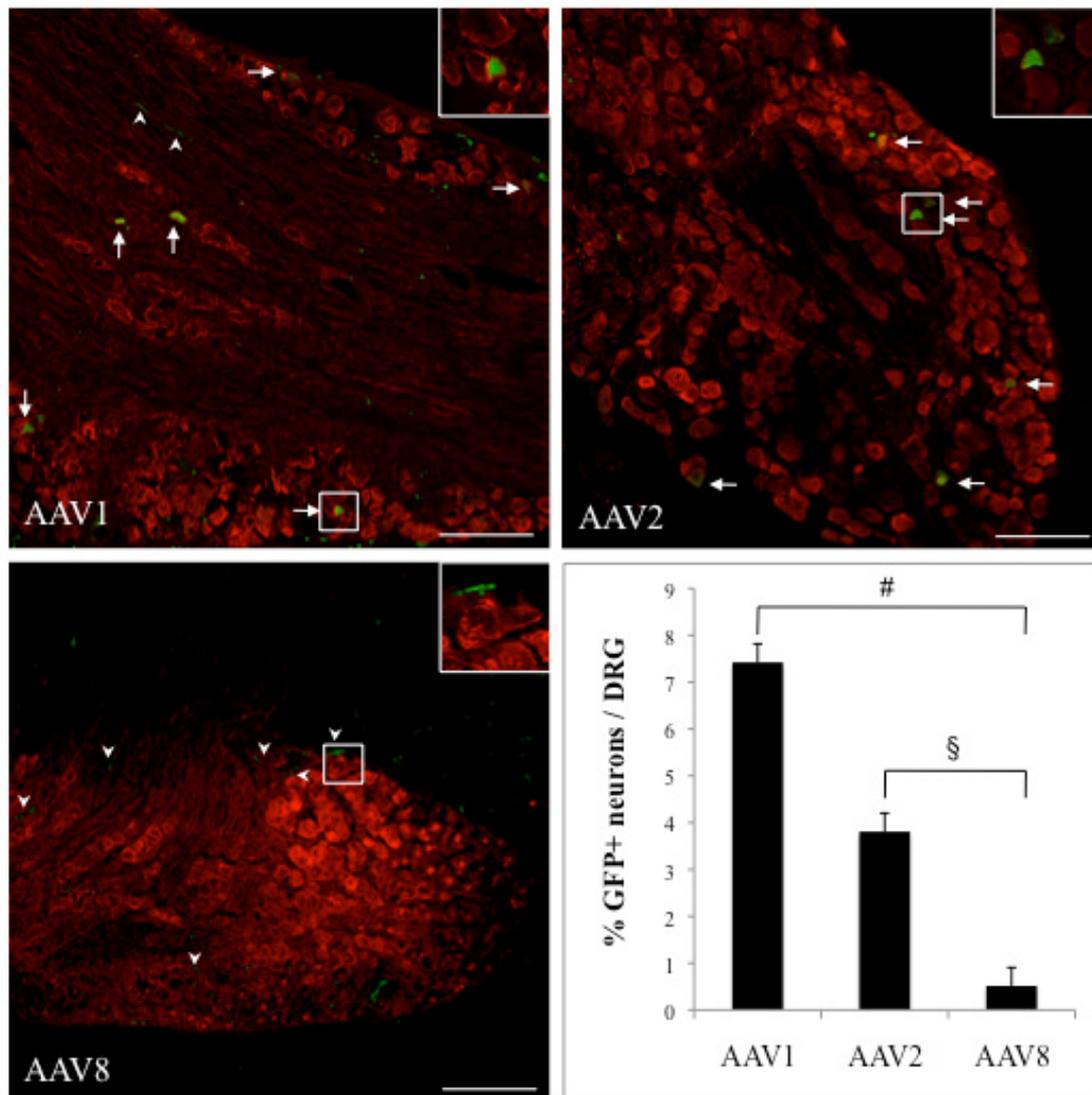


Fig. 1

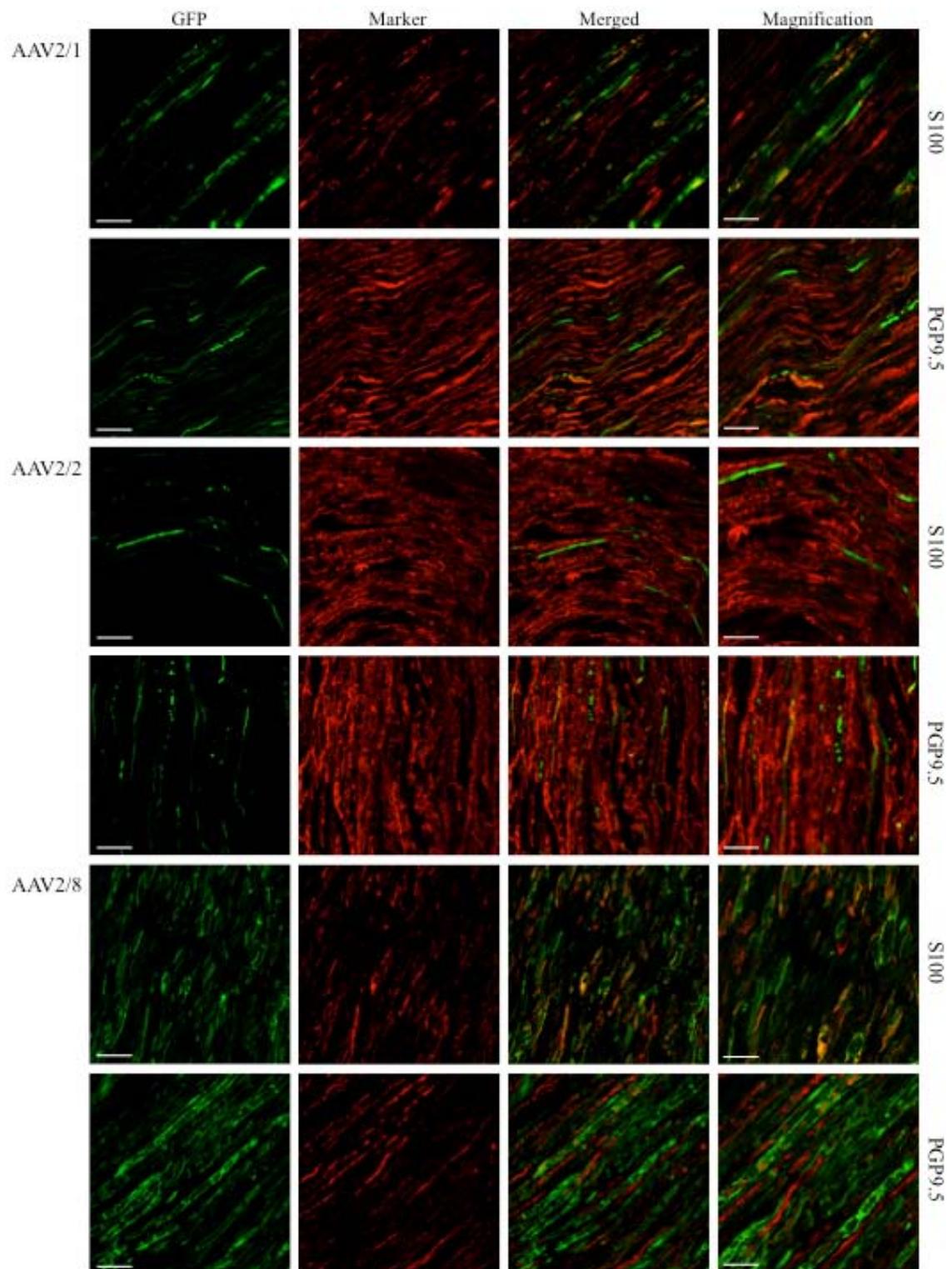
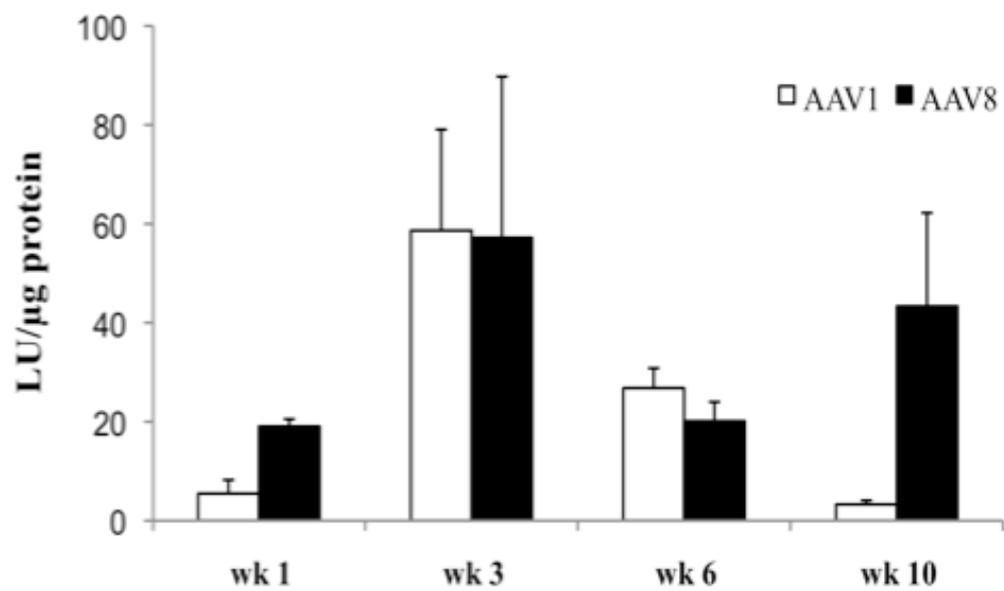
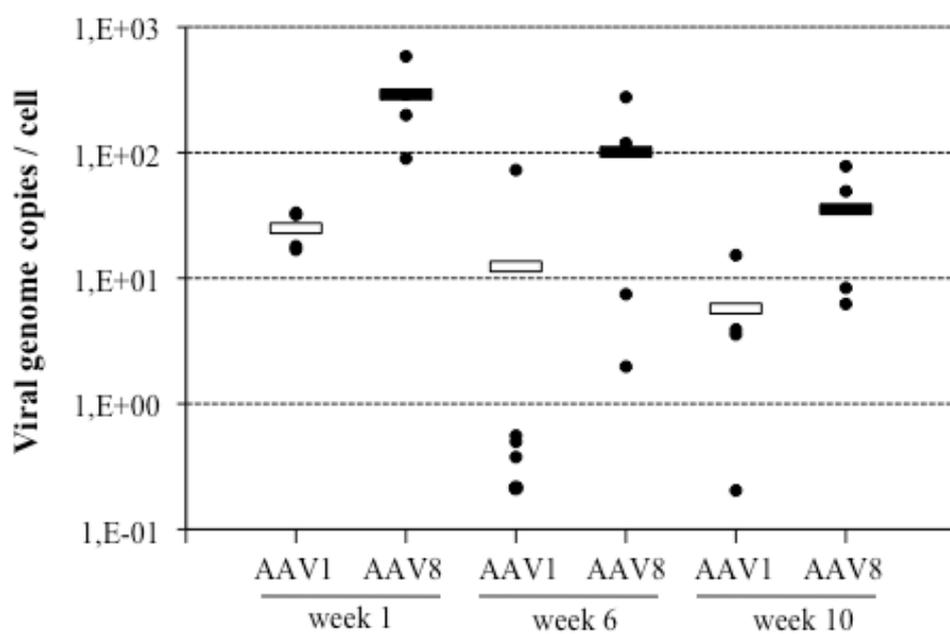


Figure 2

**A**



**B**



**Figure 3**

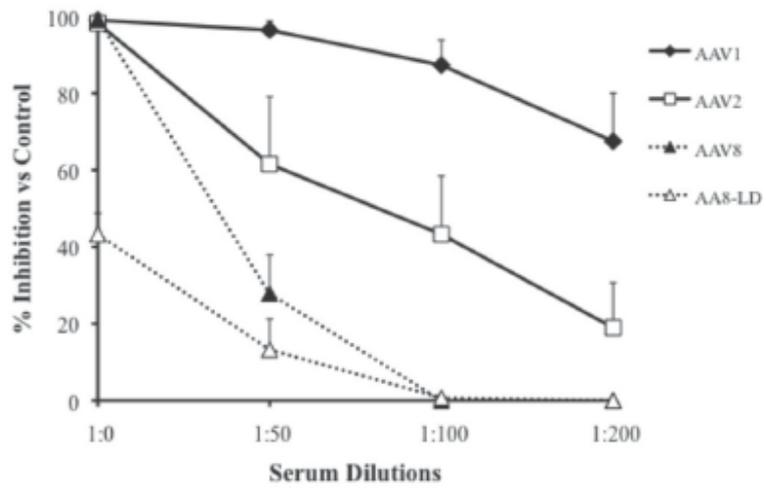


Figure 4

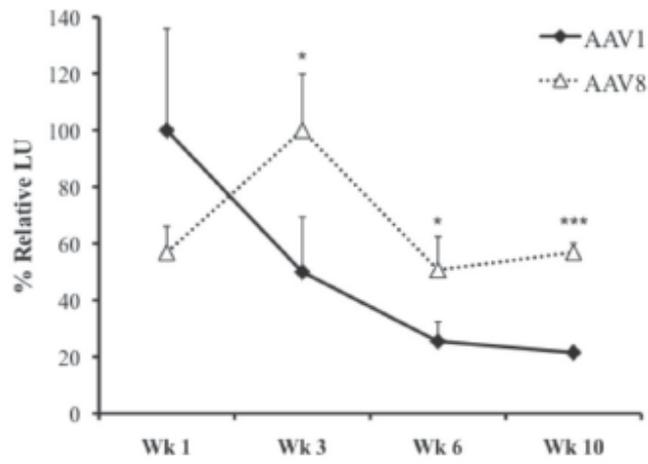
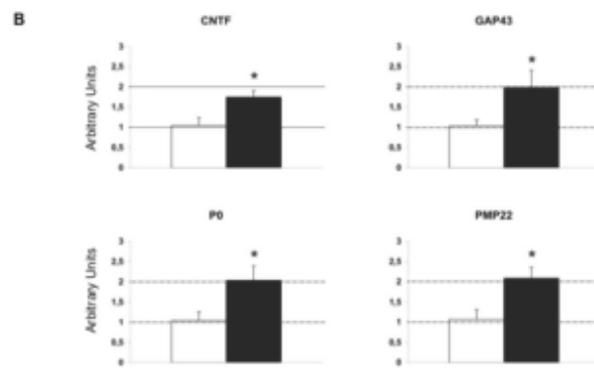
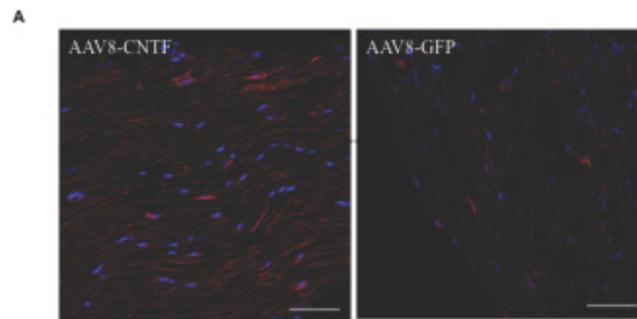
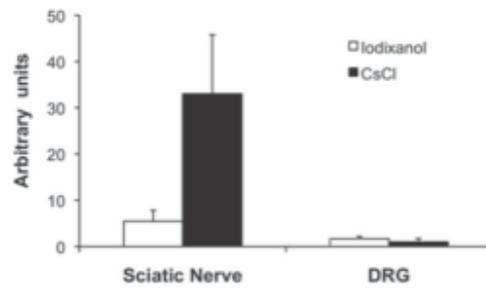


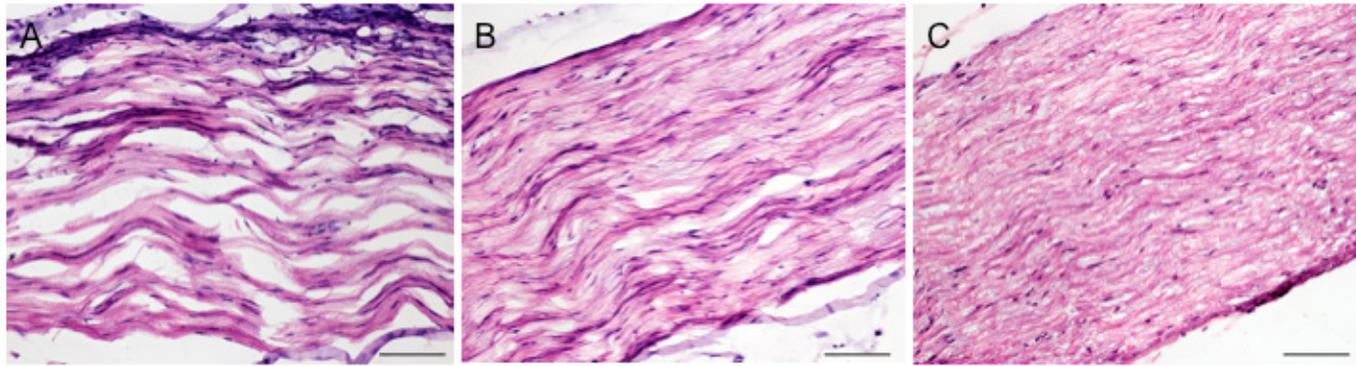
Figure 5



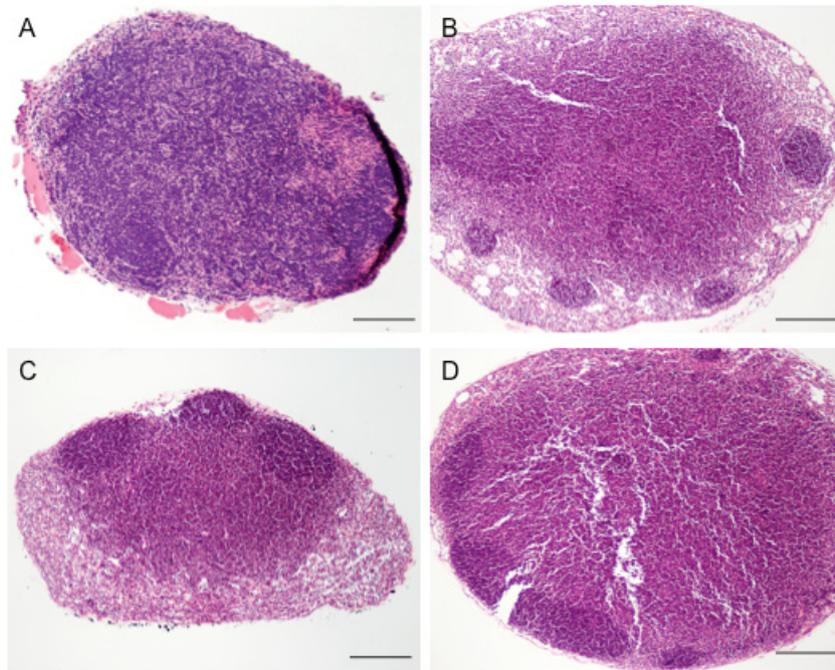
**Fig. 6**



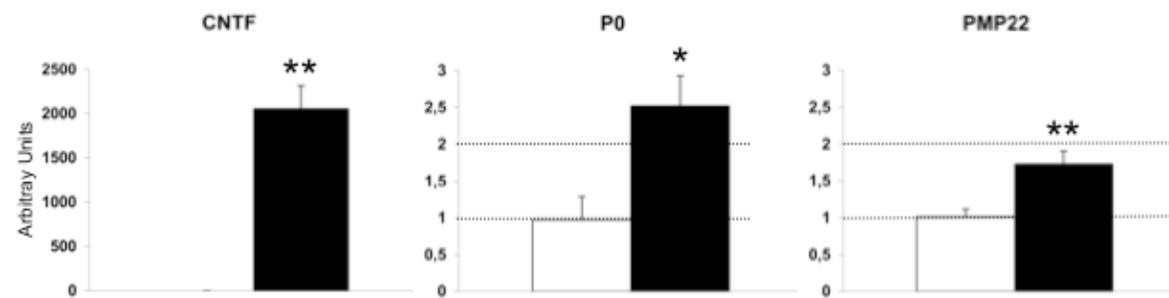
**Supplementary Fig. S1**



Supplementary Fig. S2



Supplementary Fig. S3



Supplementary Fig. S4

## **ANEXO 2. Artículo enviado a Experimental Neurology**

Comparative study of peripheral neuropathy and nerve regeneration  
in NOD and ICR diabetic mice

J. Homs<sup>1</sup>, L. Ariza<sup>1</sup>, E. Verdú<sup>2,3</sup>, L. Casals<sup>2,3</sup>, M. Chillón<sup>1,4</sup>, X. Navarro<sup>2,3</sup> & A. Bosch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology and Centre de Biotecnologia i Teràpia Gènica (CBATEG), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Physiology and Immunology and Institute of Neurosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>3</sup>CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, Spain

<sup>4</sup>Institut 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](mailto: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  $\text{NAD}^+$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 algometer (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-ribosyl)ated proteins continued increasing up to 3.5 times in both models. No differences in poly(ADP-ribosyl)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 algesimetry 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  $\mu\text{m}$  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 18<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> week of age, however weekly monitoring of blood glucose levels of these animals is needed from week 12<sup>th</sup> 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.

## 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<sup>+</sup> 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 <sup>a</sup> ICR-c, <sup>b</sup> 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  $\mu$ m.

**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  $\mu$ m.

**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.

## REFERENCES

1. Andriambeloson, 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., Charniauskaya, 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., 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.
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 streptozocin-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)		
	day	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 <sup>ac</sup>
<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 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.7	3.0 ± 0.6 <sup>abc</sup>
MNCV (m/s)		39.5 ± 1.5	42.2 ± 1.9	38.4 ± 0.8	34.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	40.2 ± 2.3	43.0 ± 1.3 <sup>b</sup>	42.8 ± 3.6	41.5 ± 2.3 <sup>b</sup>	37.2 ± 2.4	33.2 ± 2.2 <sup>acd</sup>
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 <sup>a</sup>	43.3 ± 1.6 <sup>b</sup>	44.0 ± 1.1 <sup>b</sup>	44.2 ± 1.8	43.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	41.1 ± 2.2	36.9 ± 2.2 <sup>ac</sup>
SNCVd (m/s)		36.3 ± 1.0	36.9 ± 0.9	34.1 ± 0.6	30.1 ± 0.9 <sup>a</sup>	35.8 ± 0.7	37.0 ± 0.7 <sup>b</sup>	31.5 ± 1.4	31.2 ± 0.9 <sup>c</sup>	31.9 ± 1.4	30.6 ± 1.5 <sup>ac</sup>

P<0.05 versus <sup>a</sup> ICR-c, <sup>b</sup> ICR-d, <sup>c</sup> NOD-c, <sup>d</sup> 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)		
	dpi	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 <sup>a</sup>	14.3 $\pm$ 1.3	3.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	14.9 $\pm$ 1.3	3.2 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	11.8 $\pm$ 1.5	3.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	7.9 $\pm$ 1.2 <sup>abc</sup>
<i>Plantar muscle</i>											
CMAP (mV)		0.5 $\pm$ 0.05	1.7 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.2 <sup>ac</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>ac</sup>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
MNCV (m/s)		7.9 $\pm$ 0.8	17.0 $\pm$ 1.1	7.8 $\pm$ 1.1	9.8 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	8.2 $\pm$ 0.7	14.0 $\pm$ 1.1	8.6 $\pm$ 0.6	11.0 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	8.3 $\pm$ 4.0	10.9 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
<i>Digital nerve</i>											
CNAP ( $\mu$ V)		0 $\pm$ 0	4.2 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0	0.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0	3.0 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0	0.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0	0.5 $\pm$ 0.5 <sup>ac</sup>
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 <sup>a</sup>		6.6 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>		4.0 $\pm$ 0.7 <sup>ac</sup>		3.0 $\pm$ 0.2 <sup>ac</sup>
Pinprick score		2.8 $\pm$ 0.3	8.4 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.4	5.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>

P<0.05 versus <sup>a</sup> ICR-c, <sup>b</sup> ICR-d, <sup>c</sup> NOD-c, <sup>d</sup> 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)
<b>Intact nerves</b>					
ICR-c (n=4)	1083 ± 59	5.605 ± 0.055	3.096 ± 0.036	0.610 ± 0.006	1.255 ± 0.031
ICR-d (n=4)	999 ± 49	5.470 ± 0.119	2.928 ± 0.174	0.577 ± 0.010	1.271 ± 0.028
NOD-c (n=4)	1021 ± 46	5.592 ± 0.056	2.978 ± 0.122	0.555 ± 0.020	1.257 ± 0.055
NOD-d mid (n=3)	963 ± 55	5.617 ± 0.497	3.020 ± 0.307	0.603 ± 0.005	1.290 ± 0.085
NOD-d high (n=4)	756 ± 54 <sup>ab</sup>	5.790 ± 0.144	3.127 ± 0.067	0.586 ± 0.007	1.280 ± 0.057
<b>Crushed nerves</b>					
ICR-c (n=4)	720 ± 78	4.094 ± 0.255	2.347 ± 0.111	0.610 ± 0.016	0.873 ± 0.074
ICR-d (n=4)	646 ± 46	3.345 ± 0.168	1.975 ± 0.146	0.614 ± 0.016	0.685 ± 0.018
NOD-c (n=4)	697 ± 37	4.020 ± 0.046	2.204 ± 0.055	0.563 ± 0.014	0.906 ± 0.050
NOD-d mid (n=3)	687 ± 28	3.425 ± 0.068	2.063 ± 0.039	0.608 ± 0.004	0.681 ± 0.015
NOD-d high (n=4)	503 ± 75	3.335 ± 0.042	1.979 ± 0.021	0.605 ± 0.004	0.679 ± 0.012

P<0.05 versus <sup>a</sup> ICR-c, <sup>b</sup> NOD-c. ANOVA with Bonferroni posthoc tests. Data are expressed as mean ± SEM.



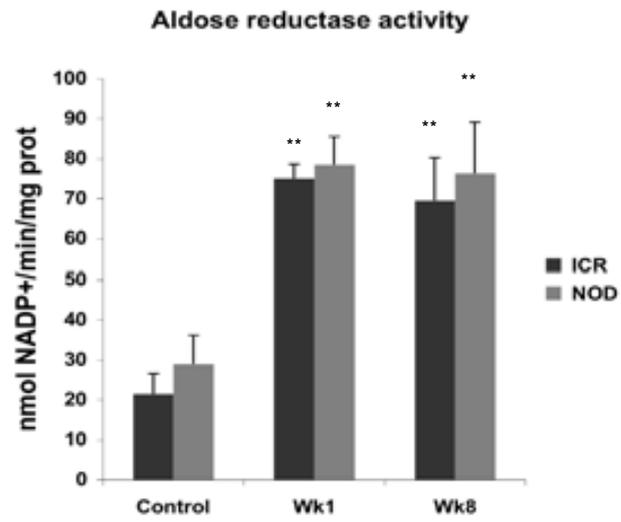
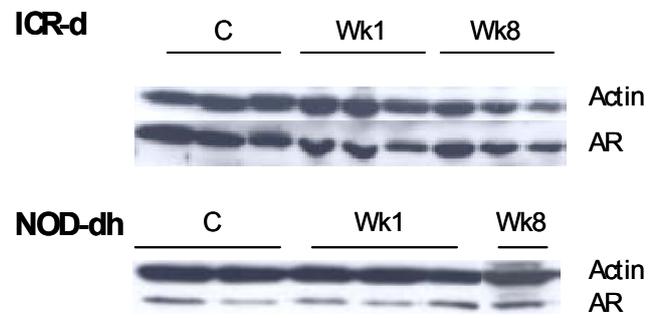
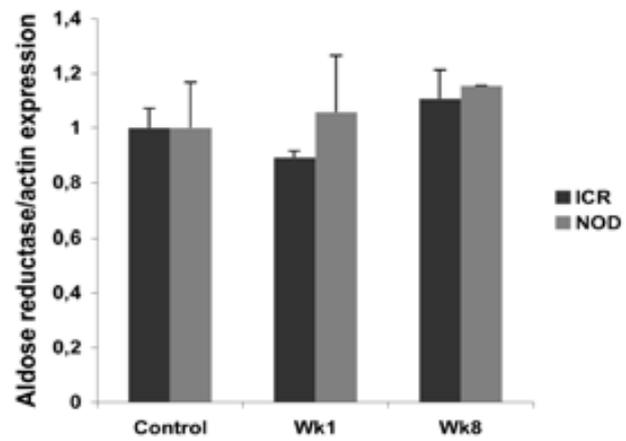
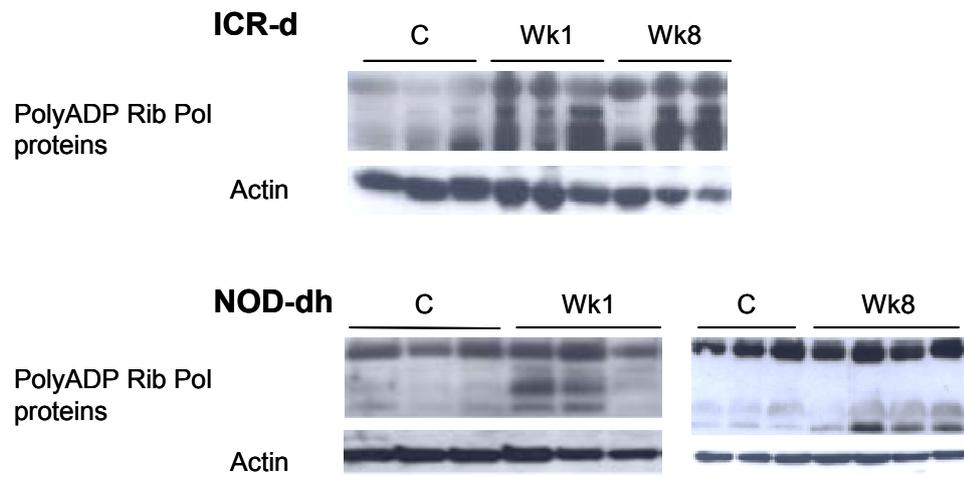
**A****B****C**

Fig. 2

**A**



**B**

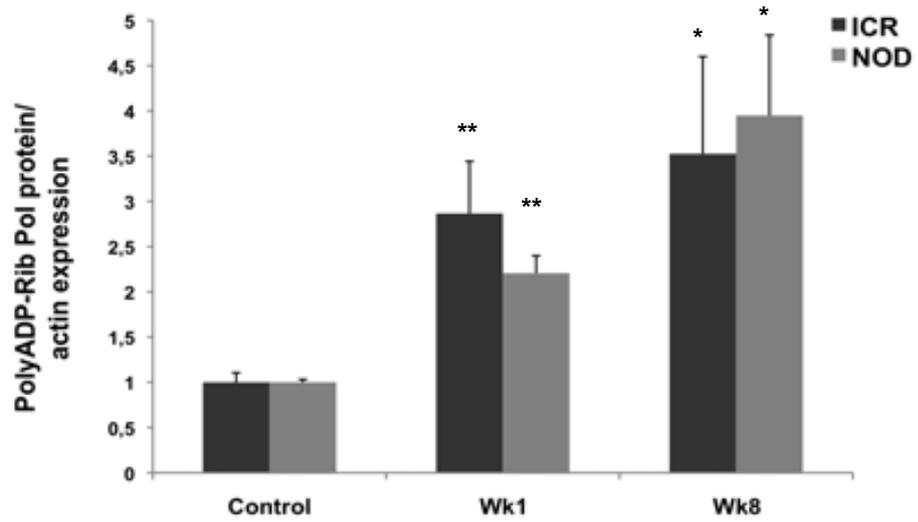


Fig. 3

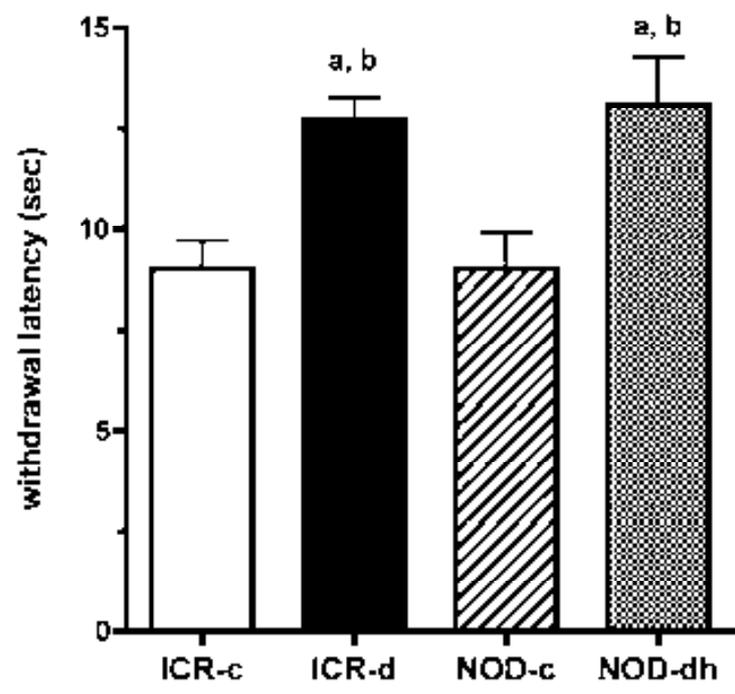


Fig.

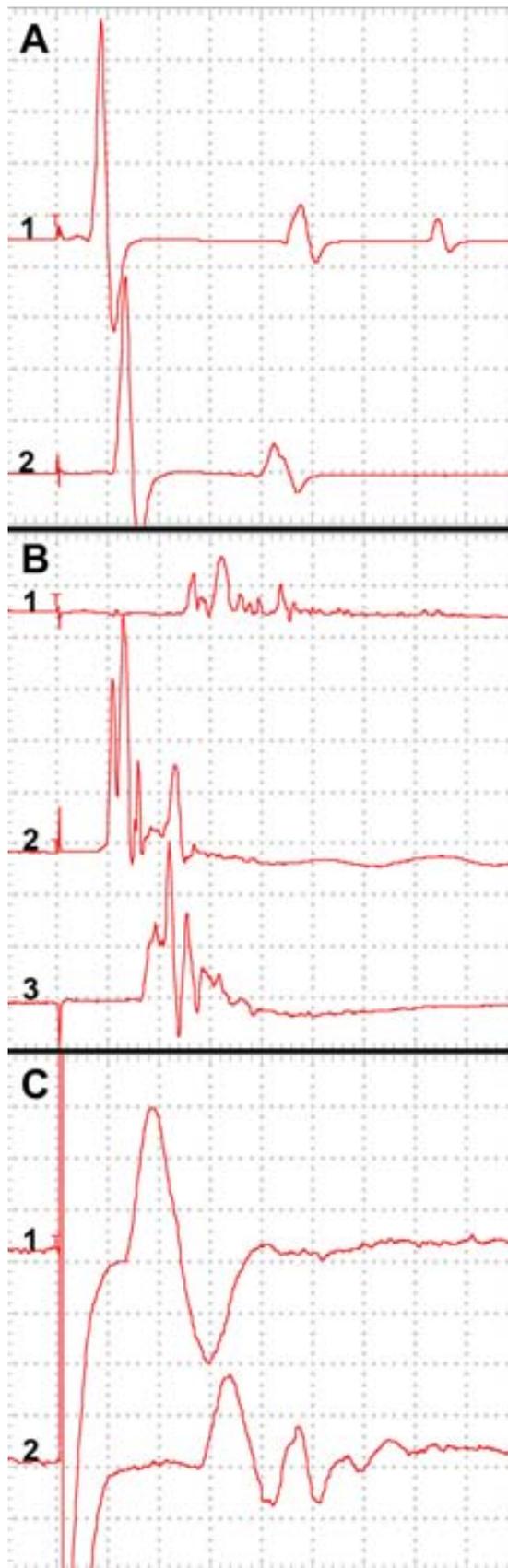


Fig. 5

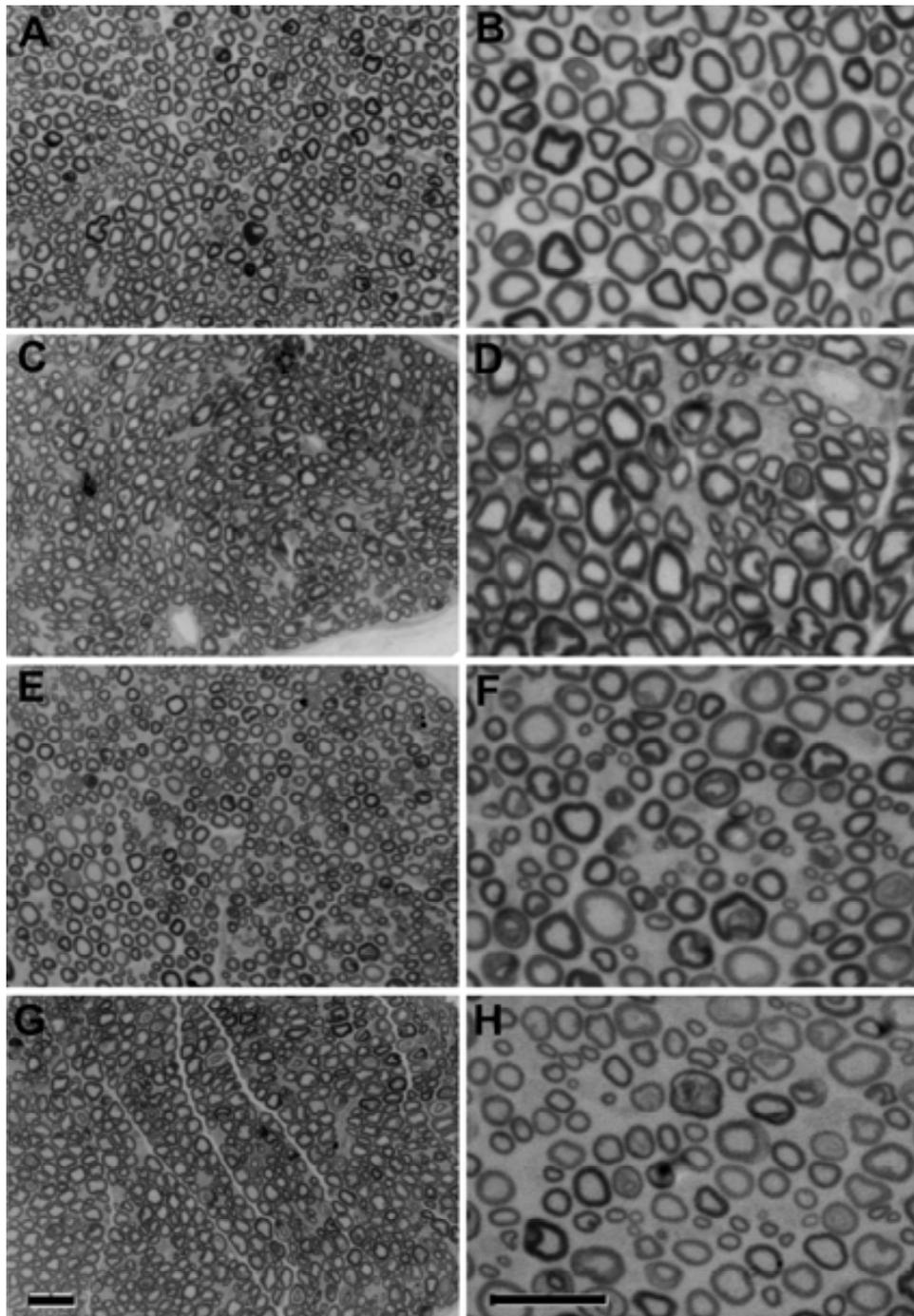


Fig. 6

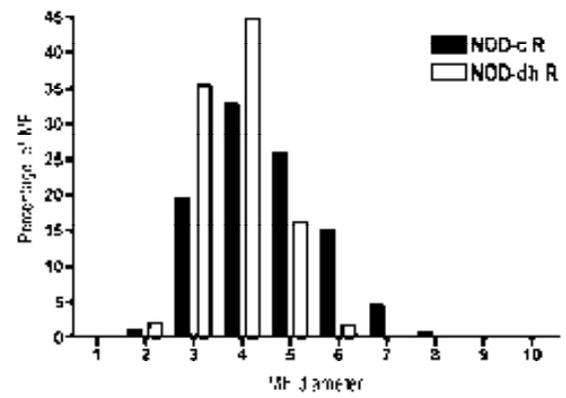
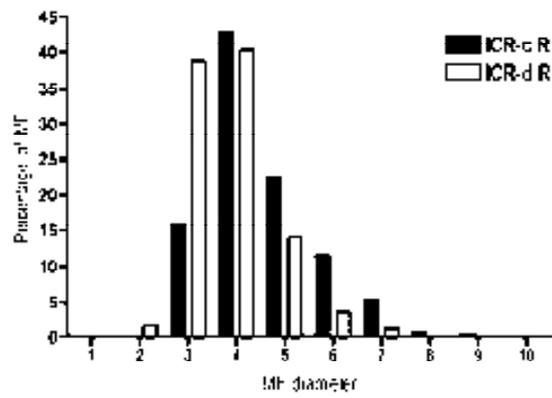
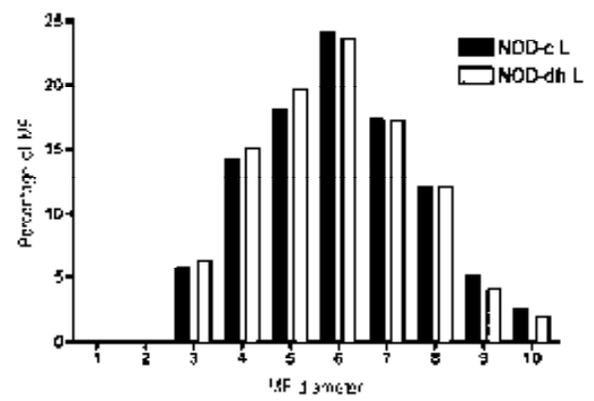
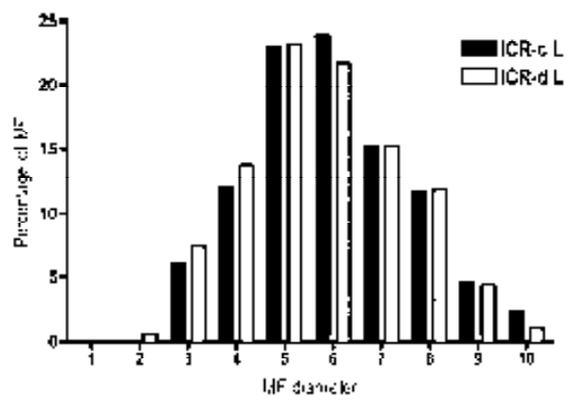


Fig. 7

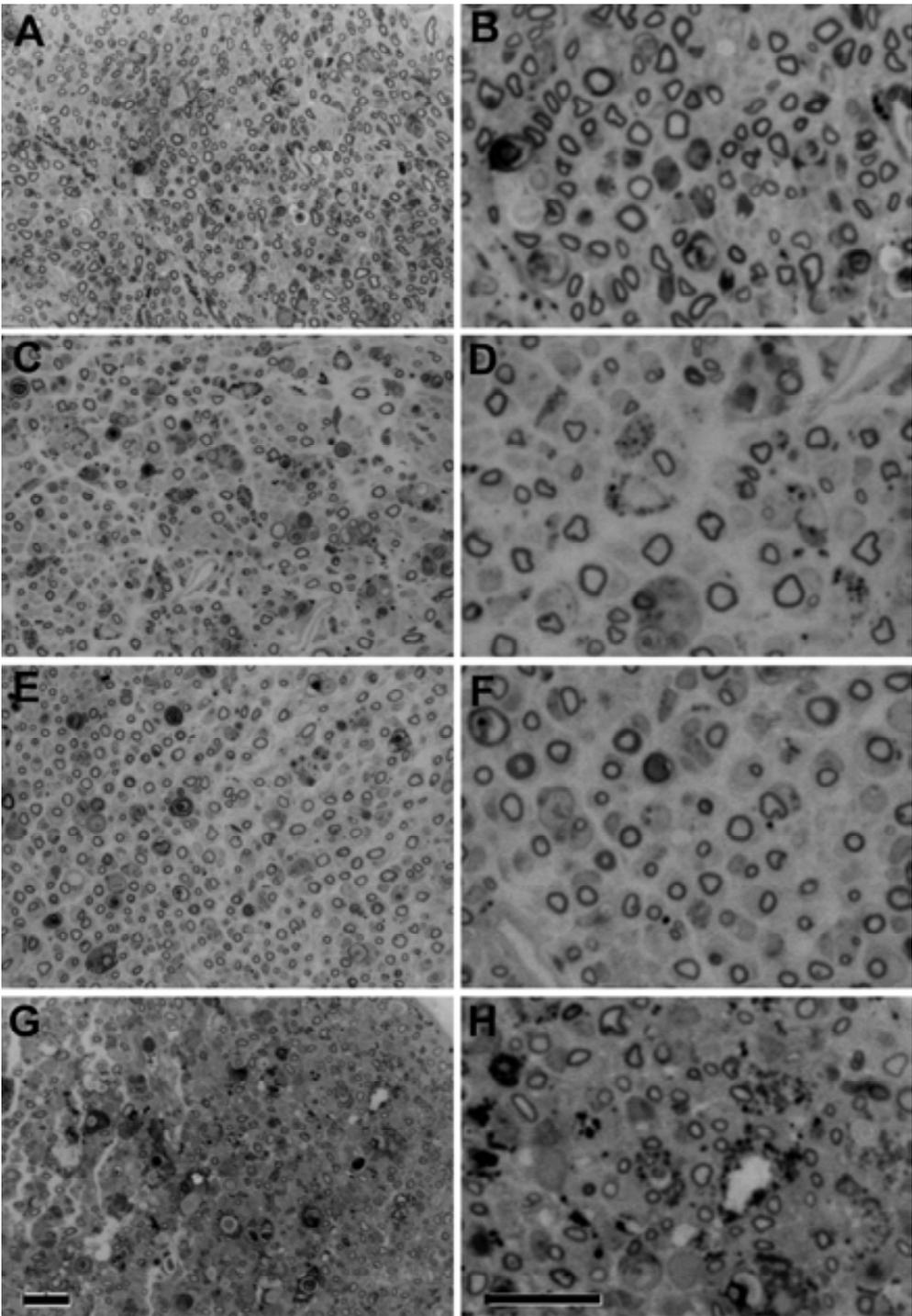


Fig. 8

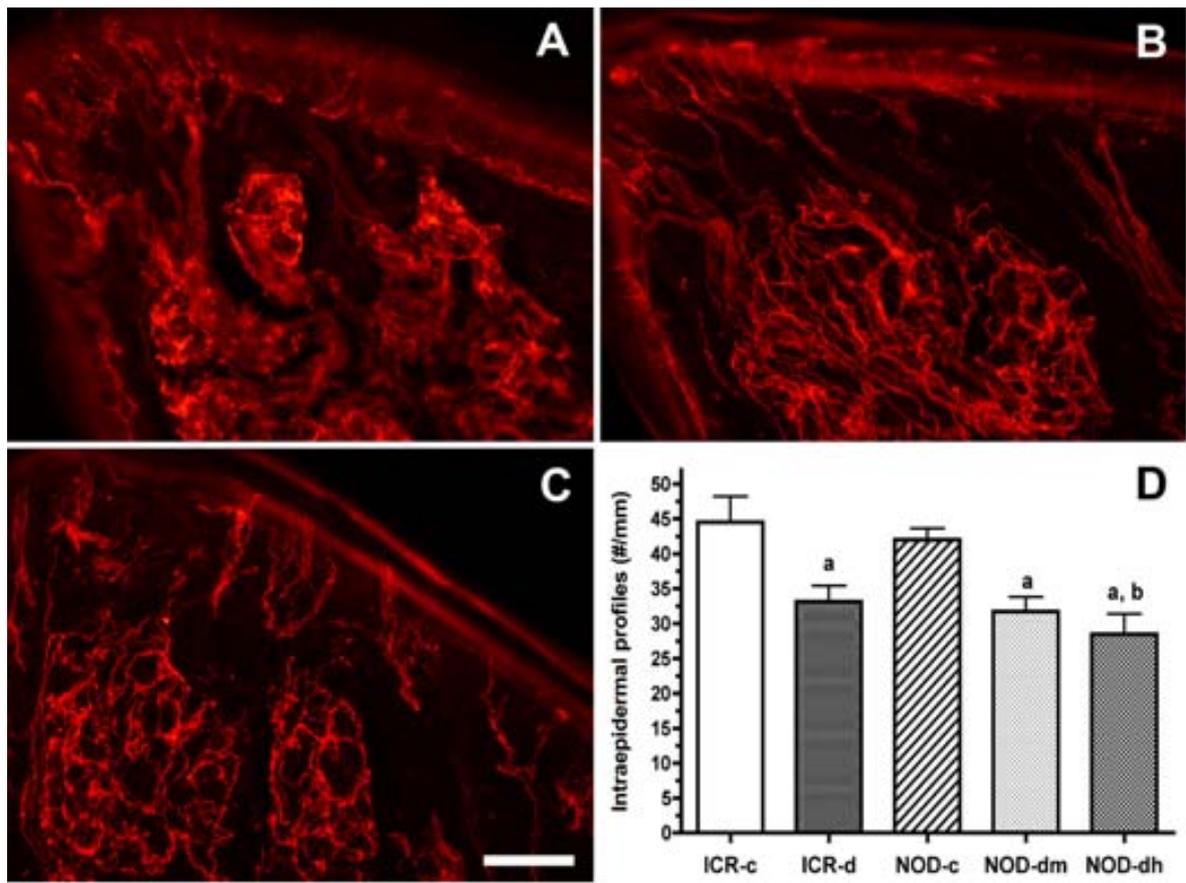


Fig. 9

