

Impacte Metabòlic de l'Activació de la Glicogen Sintasa Hepàtica

Susana Ros Domínguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Impacte metabòlic de l'activació de la glicogen sintasa hepàtica

SUSANA ROS DOMÍNGUEZ
Barcelona, Juny del 2009

RESULTATS I DISCUSSIÓ: CAPÍTOL 2

EFFECTES METABÒLICS DE L'EXPRESSIONI HEPÀTICA DE LGS

2+3b EN RATA SANA

2.1 Introducció

Els resultats descrits en el capítol anterior mostren que la mutació de serina a alanina del lloc de fosforilació 2 en la LGS, o les mutacions en aquesta serina i en un dels sis llocs de fosforilació restants, produeix formes de LGS constitutivament actives, i per tant capaces de produir un augment en l'acumulació de glicogen quan s'expressen en cèl·lules FTO2B o en cultiu primari d'hepatòcits. En el cas de les cèl·lules FTO2B, l'expressió d'aquestes formes de LGS és capaç de restaurar la síntesi de glicogen tot i l'absència de la GK, per tant aquest seria un marc semblant a l'estat diabètic on la GK es troba molt disminuïda degut als baixos nivells d'insulina (Iynedjian 1993). En el cas dels hepatòcits, l'expressió d'aquestes formes de LGS permet que es sintetitzi glicogen fins i tot quan les cèl·lules són incubades en absència de glucosa però en presència d'aminoàcids. En la diabetis la síntesi de glicogen mitjançant la via directa clàssica, a partir de glucosa, es troba disminuïda, però la síntesi a partir de precursors gluconeogènics es troba lleugerament augmentada (Soares, Viega et al. 2009), el que pot ésser degut a la baixa activitat GK (Velho, Petersen et al. 1996), o a l'increment en l'activitat de la PEPCK (Kramer, Giffin et al. 1999). Per tant, aquests resultats suggereixen que la sobreexpressió *in vivo* d'aquestes formes de l'enzim podria restaurar la síntesi de glicogen, el que podria conduir a la millora en l'homeòstasi de la glucosa.

De fet, s'han descrit diferents aproximacions per augmentar la capacitat d'acumulació de glicogen en fetge per intentar reduir l'hiperglicèmia. Una de les complicacions que presenten la majoria d'aquestes aproximacions és que la diana és una proteïna, com per exemple la GK, la PTG, la GSK-3, el proto-oncogen c-myc, que està involucrada en

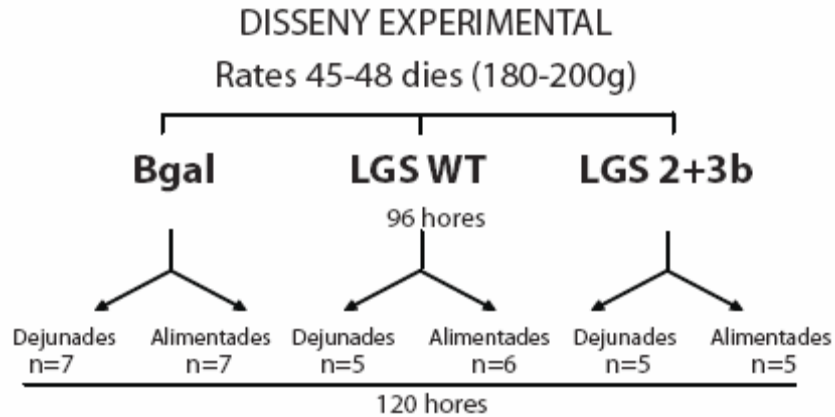
molts processos biològics, fent difícil establir si la millora en l'homeòstasi de la glucosa és només deguda a un augment en l'acumulació de glicogen en el fetge.

Per tant, el segon capítol d'aquest projecte es centra en l'estudi d'un augment en l'activitat de la LGS en fetge, i per tant un augment en la síntesi de glicogen en aquest òrgan, i del seu impacte en l'homeòstasi de la glucosa. Primer es va estudiar l'efecte en models animals sans, per a posteriorment estudiar-ho en models diabètics. L'aproximació experimental ha estat la sobreexpressió en fetge de la LGS 2+3b, mitjançant injecció d'una preparació adenovirus purificats per vena caudal en rata sana. Primer ens varem centrar en el metabolisme de la glucosa en els animals alimentats o sotmesos a un dejuni de 18 hores, i després es va estudiar la tolerància al monosacàrid. A més, es va estudiar si es produïen alteracions en d'altres paràmetres metabòlics, o en l'expressió d'altres enzims relacionats amb el metabolisme de la glucosa.

2.2 Efectes de l'expressió hepàtica de la LGS 2+3b en rates alimentades *ad libitum* o dejunades durant 18 hores

El disseny experimental va consistir en la injecció per vena caudal en rata d'una preparació d'adenovirus purificats que codifiquen per la LGS 2+3b, a una concentració de $2 \cdot 10^{12}$ pfu / ml. Com a grups control es van injectar rates amb preparacions d'adenovirus, a la mateixa concentració, que codifiquen per la β -galactosidasa d'*E. coli* (Bgal) o per a la forma salvatge de la LGS (LGS WT). Després de 96 hores de la injecció, els animals es van dividir en dos grups, el primer va seguir alimentat *ad libitum* i el segon va ésser sotmès a un dejuni de 18 hores amb només accés a l'aigua de beguda (**Esquema Disseny Experimental**). Passat aquest temps, els animals es van sacrificar mitjançant una injecció intraperitoneal de tiobarbital (0,1 g/kg pes), es va col·lectar la sang i es van extreure els diferents teixits d'interès, que van ésser immediatament congelats a -80°C fins la seva anàlisi.

Els animals usats per aquest estudi presentaven uns valors d'aspartat-aminotransferasa (AST) inferiors a 300 U/l, indicatiu de absència de dany hepàtic.



2.2.1 Estudi de l'expressió del transgen en diferents teixits

Estudis previs en rata (Trinh, O'Doherty et al. 1998) i en ratolí (Herz and Gerard 1993) han establert que la infusió sistèmica d'adenovirus purificats resulta en una distribució del transgen preferentment hepàtica. Es va voler comprovar que es produïa aquest efecte en el nostre cas.

L'anàlisi per Western blot de diferents teixits de les rates injectades amb els adenovirus que codifiquem per la LGS WT o la LGS 2+3b amb l'anticòs que reconeix la LGS, mostren que l'expressió de la LGS 2+3b o de la LGS WT es va produir només a nivell hepàtic (**Fig.1**), doncs només es detectava senyal en els extractes de fetge, i no en el teixit adipós, pàncrees, ronyó, testicle, pulmó o múscul *gastrocnemius*.

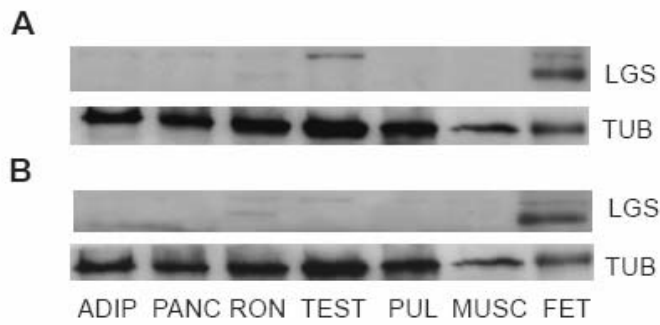


Fig.1 Anàlisi mitjançant Western blot de l'expressió de la LGS en els diferents teixits de les rates injectades.

Anàlisi representatiu de teixit adipós (ADIP), pàncrees (PAN), ronyó (RON), testicle (TEST), pulmó (PUL), múscul gastrocnemius (MUSC) i fetge (FET) dels grups de rates alimentades

que havien estat injectades amb la LGS WT (A) o la LGS 2+3b (B) amb anticossos contra l'enzim total (LGS) o la gamma-tubulina (TUB) com a control de càrrega. En tots els casos (A i B) s'han analitzat 20 µg de proteïna per carril.

2.2.2 Quantificació de l'ARNm del gen de LGS en fetge

Un cop establert que l'expressió dels diferents transgens es va produir en el fetge, es va quantificar l'ARN missatger de la LGS en aquest òrgan. El propòsit era analitzar si l'eficiència de la sobreexpressió havia estat semblant entre els grups que sobreexpressaven la LGS WT o la LGS 2+3b. Així doncs es va extreure l'ARN del fetge de les rates injectades, es va procedir a la seva retrotranscripció i la posterior detecció de l'ADNc es va dur a terme per PCR quantitativa a temps real (RT-Q-PCR) usant una sonda específica per LGS.

La sobreexpressió de la LGS WT o la LGS 2+3b produí un increment molt notable en l'abundància d'ARNm de LGS en el fetges de les rates tant alimentades com dejunades en comparació amb la del grup de rates que sobreexpressaven la Bgal (**Fig. 2**). Sembla que es va produir una menor eficiència en el grup de rates dejunades injectades amb l'adenovirus que codificava per la LGS WT, que potser es pot atribuir a una menor estabilitat de l'ARNm de la LGS no modificada en aquest estat metabòlic en particular. No es van detectar però diferències significatives entre la quantitat d'ARNm de LGS dels grups de rates infectades amb Bgal dejunades o alimentades, el que ja s'havia descrit prèviament (Nur, Sela et al. 1995).

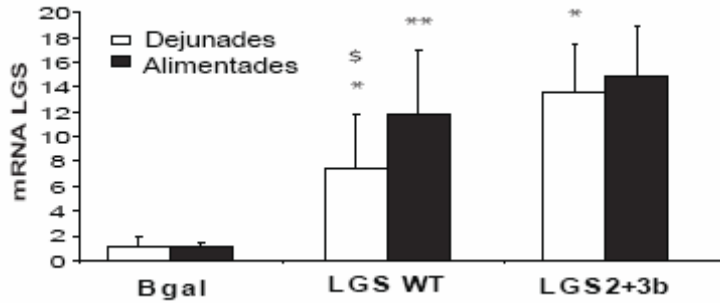


Fig.2 Quantificació de l'ARNm de LGS en el fetge. Anàlisi per RT-Q-PCR de l'expressió relativa del gen de la LGS en el fetge de les rates que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b que havien estat alimentades (barres negres) o dejunades (barres blanques) durant les 18

hores finals de l'experiment. En tots els casos els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS WT, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b i 5 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa amb * $p < 0,05$ i ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates en el mateix estat metabòlic que expressen la Bgal, i \$ $p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b.

2.2.3 Activitat GS en fetge

Es va mesurar l'activitat GS en presència de Glc6P. La sobreexpressió de la LGS WT o la LGS 2+3b produïa un lògic increment en aquesta activitat en fetge, si es comparava amb la de les rates que sobreexpressaven la Bgal (**Fig. 3A**). Aquesta activitat era menor en les rates que sobreexpressaven la LGS WT dejunades respecte a les que sobreexpressaven la LGS 2+3b, però no es trobaven diferències significatives entre aquests dos grups si les rates havien restat alimentades.

També es va mesurar l'activitat GS en absència de Glc6P. La sobreexpressió de la LGS 2+3b va provocar un gran increment en aquest valor tant en les rates dejunades com les alimentades, sense cap diferència significativa entre ambdós grups (**Fig. 3B**). Les rates que sobreexpressaven la LGS WT tenien uns valors lleugerament superiors als de les rates que sobreexpressaven la Bgal, molt lluny del de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Pel que fa a les rates control que sobreexpressaven la Bgal, l'activitat GS en

absència de Glc6P es trobava augmentada en el grup d'animals dejunats respecte als que havien restat alimentats (**Fig. 3B**), tot i que l'activitat GS total mesurada no era diferent entre els dos grups. Aquesta activació de la LGS endògena en dejú ja havia estat descrita prèviament (Curnow and Nuttall 1972; van de Werve and Jeanrenaud 1987; Nuttall and Gannon 1989; Gannon and Nuttall 1997).

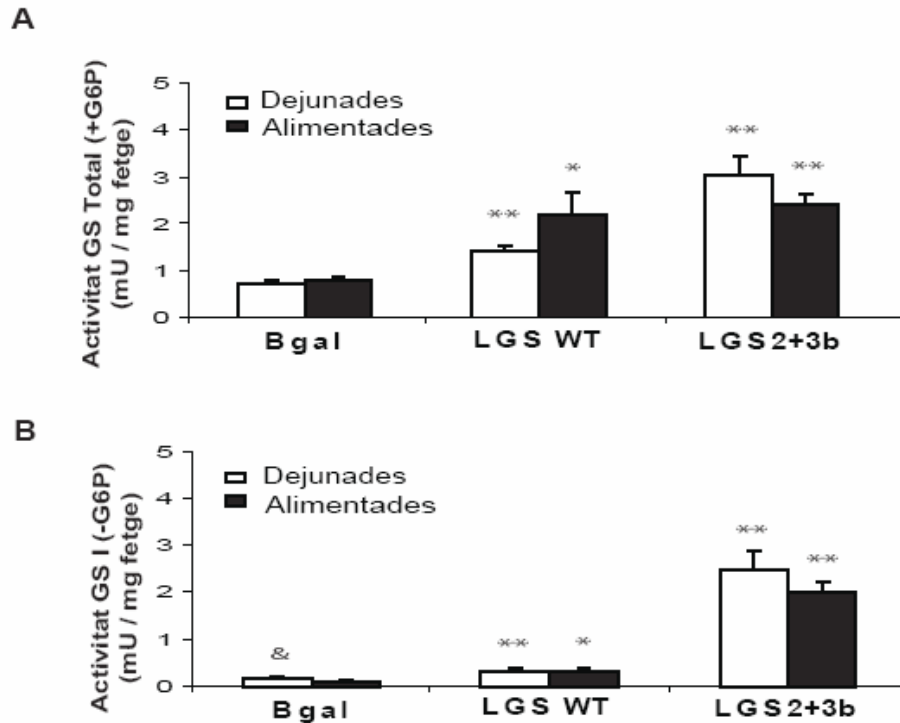


Fig.3 Activitat GS en fetge. A) Activitat GS total dels homogenats de fetge de les rates alimentades (barres negres) o dejunades durant les 18 hores finals de l'experiment (barres blanques), que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b. L'activitat està expressada en mU per mg de teixit. **B)** Activitat GS calculada en absència de Glc6P, dels homogenats dels extractes de fetge. L'activitat està expressada en mU per mg de teixit. En tots els casos (**A i B**) els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS WT, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b i 5 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa amb * $p < 0,05$ i ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates que expressen la Bgal en el mateix estat metabòlic i \$ $p < 0,05$ per comparació del grup de rates dejunades vs alimentades que sobreexpressaven la Bgal.

2.2.4 Quantificació de proteïna LGS en fetge

Adicionalment, es va fer un anàlisi de la quantitat proteïna LGS dels extractes dels fetges de les rates tant alimentades com dejunades mitjançant Western blot.

El resultat demostrà que els animals que sobreexpressaven la LGS WT o la LGS 2+3b presentaven un increment de la proteïna LGS (**Fig. 4**), quan es comparaven amb les rates que sobreexpressaven la Bgal en el mateix estat metabòlic. La LGS 2+3b presentava una major mobilitat electroforètica. Cal remarcar que en els animals dejunats que sobreexpressaven la LGS WT la quantitat de proteïna LGS era menor respecte al grup alimentat que sobreexpressava la mateixa proteïna, concordant amb la mesura de l'activitat GS total. Això pot ésser degut a una menor estabilitat de la proteïna i/o de l'ARNm de l'enzim salvatge en aquest estat metabòlic (**Punt 2.2.2 i 2.2.3**).

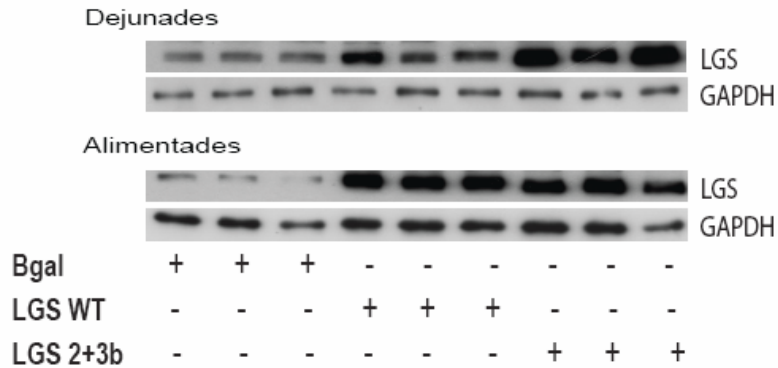


Fig.4 Quantificació de proteïna LGS per Western blot en fetge de les rates Bgal, LGS WT o LGS 2+ 3b. Anàlisi representatiu de tres extractes de fetge dels grups de rates alimentades o dejunades durant les 18 hores finals de l'experiment que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, amb anticossos contra l'enzim total (LGS) o la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) com a control de càrrega. En tots els casos s'han analitzat 20 µg de proteïna per carril.

2.2.5 Anàlisi macroscòpic del fetge

Al finalitzar l'experiment es va procedir a pesar els fetges de tots els animals. Els fetges dels animals que sobreexpressaven la LGS 2+3b que havien estat alimentats *ad libitum* durant tot l'experiment pesaven més que els dels altres grups en el mateix estat metabòlic (**Taula 2**). La relació percentual entre el pes del fetge i el pes corporal, era també més gran en els animals alimentats que sobreexpressaven la LGS 2+3b.

En canvi, les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b que havien estat dejunades durant les últimes hores de l'experiment no presentaven cap diferència en el pes del fetge o en el seu pes relatiu respecte a l'òrgan dels altres grups de rates.

| ESTAT METABÒLIC | Paràmetre | Bgal | LGS WT | LGS 2+3b |
|-----------------|-----------------------|-----------|-----------|--------------------|
| DEJUNADES | Pes fetge (g) | 7,7 ± 0,5 | 7,8 ± 1,1 | 9,5 ± 1,1 |
| | Pes relatiu del fetge | 3,2 % | 3,1 % | 3,8 % |
| ALIMENTADES | Pes fetge (g) | 9 ± 0,5 | 10 ± 0,5 | 12 ± 0,8 ** |
| | Pes relatiu del fetge | 3,4 % | 3,8 % | 4,9 % ** |

Taula 2. Pes del fetge. En la taula el pes del fetge, en grams, dels diferents grups de rates, alimentades o dejunades durant les 18 hores finals de l'experiment, que sobreexpressaven en el fetge la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, i el pes relatiu, relació percentual entre el pes del fetge i el pes corporal. Els valors representen la mitjana ± S.E.M de 7 rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS WT, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b i 5 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa amb ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates que expressen la Bgal en el mateix estat metabòlic.

Com s'ha comentat, els animals alimentats que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven un fetge més gran, el que s'observava a simple vista, respecte al mateix grup metabòlic que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT (**Fig.5**), el que potser era indicatiu d'un augment en la quantitat de glicogen acumulat.

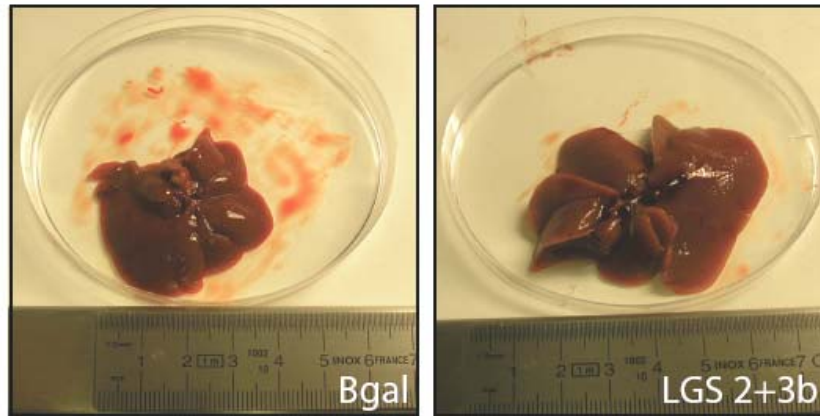


Fig.5 Anàlisi macroscòpic dels fetges. Fotografies captades del fetge dels animals que sobreexpressaven la Bgal (columna esquerra) o la LGS 2+3b (columna dreta) que havien restat alimentats ad libitum durant tot l'experiment. El fetge dels animals que sobreexpressaven la LGS 2+3b era més gran.

2.2.6 Quantificació de glicogen

Es va mesurar els efectes de la sobreexpressió de la LGS WT o la LGS 2+3b sobre el contingut de glicogen hepàtic. Les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b que havien restat alimentades presentaven una major quantitat de glicogen en fetge que les que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT (**Fig. 6A**), i el que és molt important, quan eren sotmeses a un dejuni de 18 hores presentaven uns valors de glicogen disminuïts en aquests òrgan.

Addicionalment, es va mesurar el contingut de glicogen muscular, concretament del múscul *gastrocnemius*, però no es detectaren diferències significatives entre els diferents grups que pertanyien al mateix estat metabòlic (**Fig. 6B**).

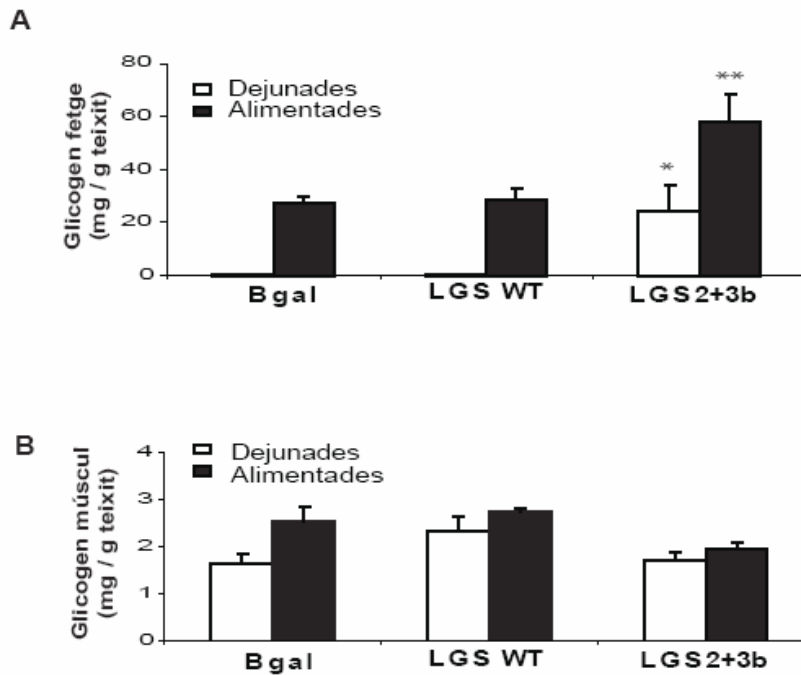


Fig.6 Quantificació del glicogen en fetge o en múscul gastrocnemius. Valors de glicogen acumulat en fetge (A) o en múscul gastrocnemius (B) de les rates alimentades (barres negres) o dejunades durant les 18 hores finals de l'experiment (barres blanques), que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b en fetge. En tots els casos (A i B) els valors, expressats en mg per g de

teixit, representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS WT, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b i 5 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa amb * $p < 0,05$ i ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates que expressen la Bgal en el mateix estat metabòlic.

2.2.7 Ultraestructura de fetge mitjançant microscòpia electrònica

Es va fer un estudi dels fetges de les rates mitjançant microscòpia electrònica, per detectar possibles canvis en l'ultraestructura cel·lular.

Les rates que sobreexpressaven la Bgal que havien estat alimentades *ad libitum* presentaven quantitats moderades de glicogen en forma de rosetes en el citoplasma dels hepatòcits (Fig. 7). Les rates alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven acumulacions molt denses de glicogen.

Els hepatòcits de les rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal presentaven menys quantitat aparent de glicogen que les rates alimentades. També s'observava un augment en lisosomes tals com cossos densos i autofagosomes, el que es propi del dejuni (Amherdt, Harris et al. 1974). Els primers són cossos envoltats de membrana amb material amorfa de diversa densitat electrònica sense cap element citoplasmàtic que es pugui reconèixer. Els segons són vacuoles que contenen orgànuls com mitocondris i reticle endoplasmàtic en diferents estats de degradació. En el cas dels hepatòcits de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b no observàvem aquestes estructures, i la quantitat de glicogen acumulat era aparentment superior. Aquests resultats concorden doncs amb els que s'obtenien per la mesura de glicogen (**Punt 2.7**).

No s'observava cap alteració indicativa de patologia en l'ultraestructura cel·lular en cap dels casos analitzats.

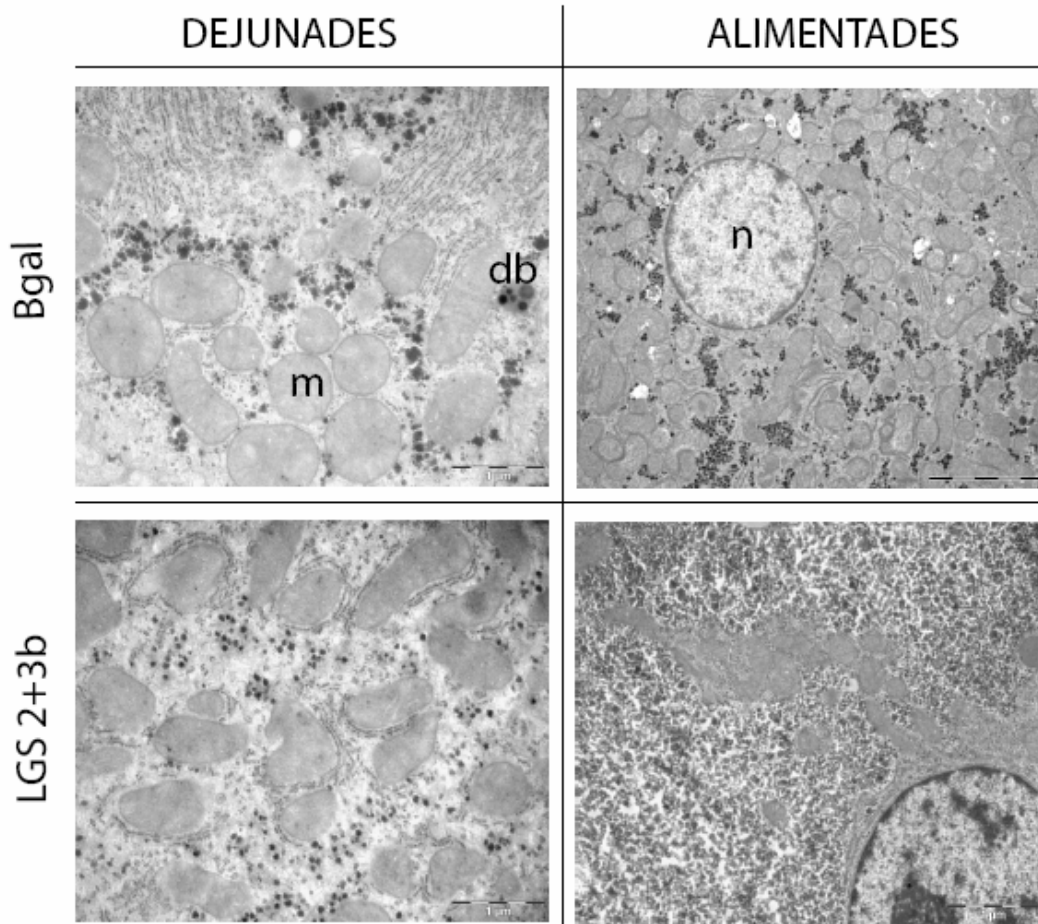


Fig.7 Ultraestructura del fetge. Anàlisi d'ultraestructura cel·lular mitjançant microscopia electrònica de biòpsies del fetge de les rates que sobreexpressaven la Bgal o la LGS 2+3b que havien estat dejunades durant 18 hores o bé havien restat alimentades ad libitum. El regle en el cas de les rates alimentades representa 5 µm i en les rates dejunades és de 1 µm. Els símbol db representa cos dens (dense bodies), n representa nucli, m respresenta mitocondri.

2.2.8 Determinació del grau de ramificació del glicogen hepàtic

Un desequilibri entre l'activitat de la GS i l'activitat de la BE, produeix un glicogen menys ramificat (Pederson, Csitkovits et al. 2003; Vilchez, Ros et al. 2007), el que pot conduir a l'acumulació d'un polisacàrid estructuralment anormal o poliglucosà (Raben, Danon et al. 2001). Aquesta mena d'acumulacions es detecten en la malaltia de Lafora (Collins, Cowden et al. 1968) i en la glicogenosi tipus IV (Tay, Akman et al. 2004). Per tant, com s'estava modificant l'activitat de la LGS hi havia la possibilitat de que el glicogen es trobés menys ramificat i es formessin cossos de poliglucosà al fetge.

Es va mesurar doncs la ramificació del glicogen aïllat del fetge de les rates que havien restat alimentades i que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, seguint el mètode de Krisman (Krisman 1962). El glicogen aïllat s'acomplexà amb triiodur i es va determinar la longitud d'ona del màxim de l'espectre d'absorció, que és funció del grau de ramificació. Com més es desplaça el màxim d'absorció cap a una longitud d'ona superior menys ramificat es troba el glicogen. El glicogen aïllat del fetge de les rates que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT presentava un pic d'absorció aproximadament a 490 nm (**Taula 3**). En canvi, el glicogen aïllat del fetge de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentava un pic a 502 nm. Aquest valor és lleugerament superior al dels grups controls, està però lluny del de l'amilopectina, que presentava un pic a 563 nm. Com a control també es va usar glicogen comercial de conill, el que presentava un pic d'absorció de 491 nm.

| POLISACÀRID | λ màx (nm) |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| Bgal glicogen fetge | 490 ± 2 |
| LGS WT glicogen fetge | 493 ± 2 |
| LGS 2+3B glicogen fetge | 502 ± 7 |
| Glicogen fetge comercial | 491 ± 2 |
| Amilopectina comercial | 563 ± 4 ** |

Taula 3. Determinació del grau de ramificació del glicogen hepàtic. La taula mostra la longitud d'ona del màxim de l'espectre d'absorció del glicogen aïllat del fetge de les rates alimentades acomplexat amb triiodur. Els resultats s'han expressat com la mitjana ± SEM de 4 rates alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 4 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS WT i 4 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Com a control es van fer mesures de l'estat de ramificació de glicogen aïllat de fetge de conill comercial, i l'amilopectina de blat de moro comercial. El símbol indica diferència significativa amb ** $p < 10^{-6}$ per comparació del grup de rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b respecte a l'amilopectina.

2.2.9 Glicèmia

Es va mesurar la glicèmia en sang perifèrica (vena caudal) a fi d'establir si un augment en l'acumulació de glicogen en fetge podia produir una disminució en els valors de glucosa en sang. La mesura de la glicèmia es duia a terme a la mateixa hora, un cop començava el cicle de 12 hores de llum.

Els animals alimentats *ad libitum* al inici de l'experiment, presentaven uns valors similars de glicèmia en sang perifèrica (vena caudal), al voltant de 120mg/dl (**Fig. 8**). No obstant, a les 120 hores aproximadament post-injecció dels adenovirus, les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b, alimentades *ad libitum*, presentaven una glicèmia lleugerament disminuïda, amb valors aproximats de 90mg/dl, respecte als altres grups que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT, la glicèmia dels quals es trobava al voltant de 120mg/dl.

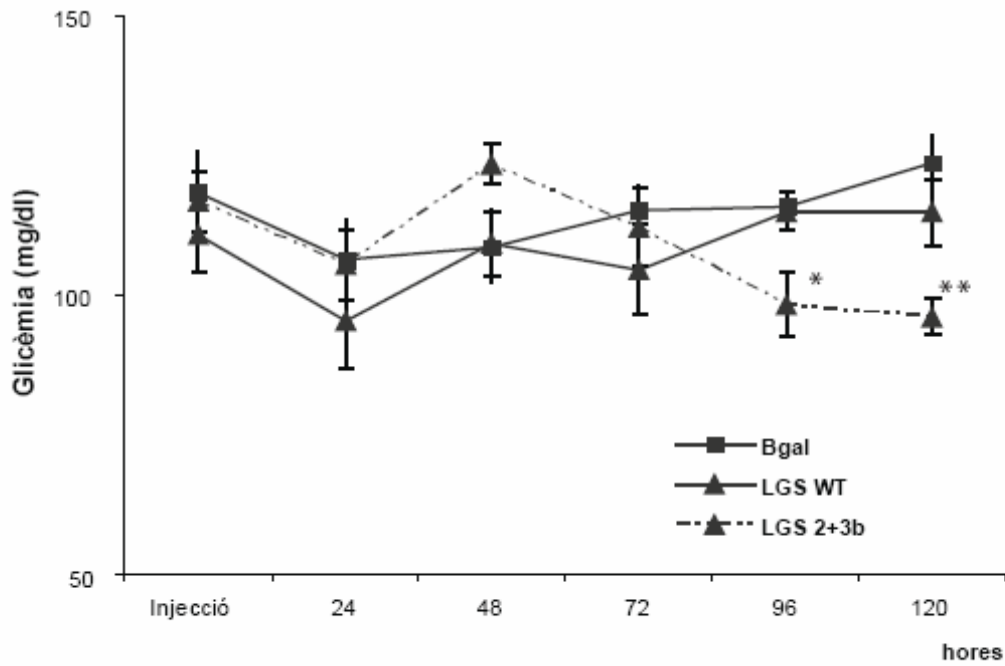


Fig.8 Glicèmia del grup de rates alimentades. La glicèmia es va mesurar en sang perifèrica (vena caudal) als temps indicats després de la injecció dels adenovirus, i cada punt representa la mitjana \pm S.E.M de 7 rates que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates que sobreexpressaven la LGS WT, i 5 rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa amb * $p < 0,05$ i ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates que expressen la Bgal.

En canvi, les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b que havien estat dejunades les 18 hores finals de l'experiment presentaven una glicèmia similar a la de les que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT, en el mateix estat metabòlic (**Taula 4**).

| | DEJUNADES | | | ALIMENTADES | | |
|-----------------------|-----------|--------|----------|-------------|---------|----------------|
| | Bgal | LGS WT | LGS 2+3b | Bgal | LGS WT | LGS 2+3b |
| Glicèmia 120h (mg/dl) | 68 ± 3 | 73 ± 4 | 84 ± 8 | 124 ± 5 | 115 ± 6 | 96 ± 3* |

Taula 4. Glicèmia les rates alimentades i dejunades. La glicèmia es va mesurar en sang perifèrica (vena caudal) a les 120 hores de la injecció dels adenovirus, en les rates que havien restat alimentades ad libitum o que havien estat dejunades durant les 18 hores finals de l'experiment. Els resultats s'han expressat com la mitjana ± SEM de 7 rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS WT, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b i 5 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb * $p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates que expressen la Bgal en el mateix estat metabòlic.

2.2.10 Concentració plasmàtica d'insulina, triglicèrids, lactat i cossos cetònics

Es van mesurar una sèrie de paràmetres plasmàtics indicatius de l'estat metabòlic al final del tractament (**Taula 5**). Els valors d'insulina en plasma calculada en aquest grup eren semblants als de les rates que sobreexpressaven la Bgal, així doncs la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b no produïa canvis en la insulinèmia dels animals. En el dejuni, els valors d'insulinèmia disminuïen, però tampoc es detectaven canvis deguts a la sobreexpressió de les diferents proteïnes.

La concentració de triglicèrids i de lactat mesurada en plasma al final del tractament era semblant entre els diferents grups (**Taula 5**). Finalment, es va determinar la concentració de cossos cetònics en plasma, en concret de l'àcid β -hidroxibutíric (BHBA). Els valors de BHBA es trobaven lògicament augmentats en les rates dejunades, però en les rates

dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b s'observava una disminució en els valors circulants d'aquest cos cetònic.

| | DEJUNADES | | | ALIMENTADES | | |
|----------------------|-----------|--------|----------------|-------------|-----------|-----------|
| | Bgal | LGS WT | LGS 2+3b | Bgal | LGS WT | LGS 2+3b |
| Insulinèmia (ng/ml) | 0,4 ± 0,2 | n.d. | 0,5 ± 0,2 | 1,4 ± 0,3 | n.d. | 1,1 ± 0,4 |
| Triglicèrids (mg/dl) | 99 ± 12 | 71 ± 8 | 104 ± 15 | 146 ± 23 | 120 ± 21 | 183 ± 46 |
| Lactat (mg/dl) | 35 ± 4 | 26 ± 5 | 28 ± 1 | 45 ± 7 | 67 ± 19 | 55 ± 9 |
| BHBA (mg/dl) | 19 ± 4 | 23 ± 1 | 8 ± 3 * | 2,2 ± 0,6 | 4,3 ± 0,9 | 3,3 ± 0,3 |

Taula 5. Concentració plasmàtica d'insulina, triglicèrids, lactat i àcid β -hidroxibutíric. Aquests paràmetres es van mesurar en plasma a les 120 hores de la injecció dels adenovirus, en les rates que havien restat alimentades ad libitum o que havien estat dejunades durant les 18 hores finals de l'experiment. Els resultats s'han expressat com la mitjana \pm SEM de 7 rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS WT, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b i 5 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb * $p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates que expressen la Bgal en el mateix estat metabòlic. El n.d. significa no determinat.

2.2.11 Expressió de la GP, GLUT 2, GK i la PEPCK en fetge

S'han descrit alguns casos on la sobreexpressió d'una proteïna condueix a una alteració en l'expressió d'altres proteïnes relacionades.

En particular, els ratolins transgènics que sobreexpressen la MGS constitutivament activa presenten un augment en la GP muscular en les fibres musculars (Manchester, Skurat et al. 1996). Estudis previs del nostre laboratori van certificar que la sobreexpressió de la LGS en cultiu d'hepatòcits no afectava l'expressió de la GP hepàtica (Gomis, Ferrer et al. 2000), però es va voler estudiar però si això també passava *in vivo* en el fetge de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b i la LGS WT.

L'anàlisi mitjançant RT-Q-PCR mostrà que no hi havia diferències significatives en la quantitat d'ARNm de GP hepàtica entre els diferents grups de rates, tant si aquestes es trobaven alimentades o dejunades (**Fig.9A i 9B**). Tampoc es van trobar diferències significatives entre els diferents grups quan es procedí a fer un anàlisi de la quantitat de proteïna per Western blot (**Fig.10A i 10B**). A part, es va estudiar l'estat d'activació de l'enzim, mitjançant un anticòs que reconeix la forma fosforilada en la Ser 14, i per tant activa, de la GP, però aquest no semblava diferir entre els diferents grups.

L'anàlisi mitjançant RT-Q-PCR mostrà que l'abundància de l'ARNm de GLUT2, de GK o de PEPCK era semblant en tots els casos (**Fig.9A i 9B**). Tanmateix, la quantitat de proteïna GK o PEPCK era semblant entre els diferents grups experimentals (**Fig.10A i 10B**).

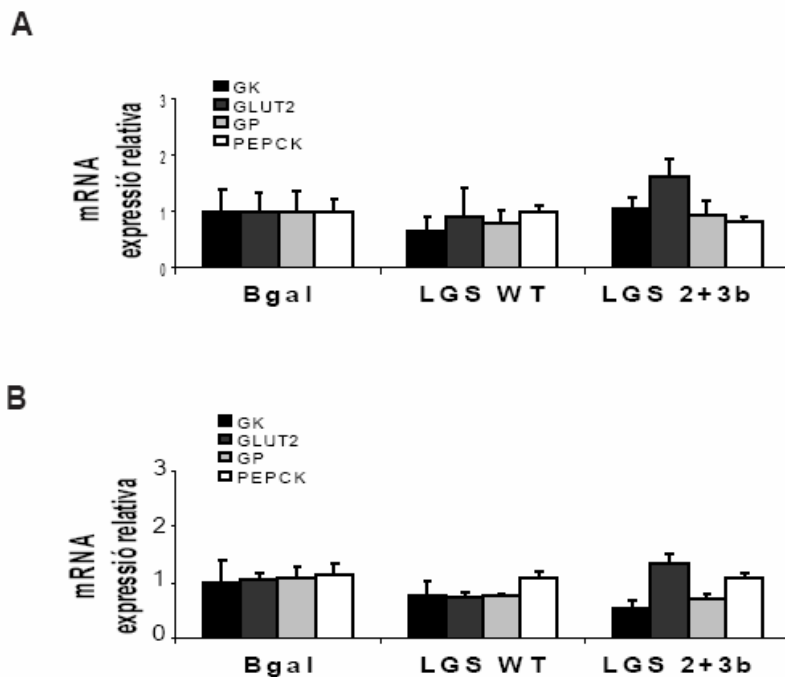


Fig.9 Quantificació de l'ARNm de GK, GLUT2, GP o PEPCK. A) Anàlisi per RT-Q-PCR de la quantitat d'ARNm de glucoquinasa (GK), el transportador de glucosa GLUT2, la glicogen fosforilasa hepàtica (GP) i la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) en els fetsges de les rates dejunades durant les 18 hores finals de l'experiment (A) i de les rates que havien restat alimentades (B). Les dades representen la mitjana \pm SEM de 7 rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS WT, 5 rates dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b i 5 rates alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b.

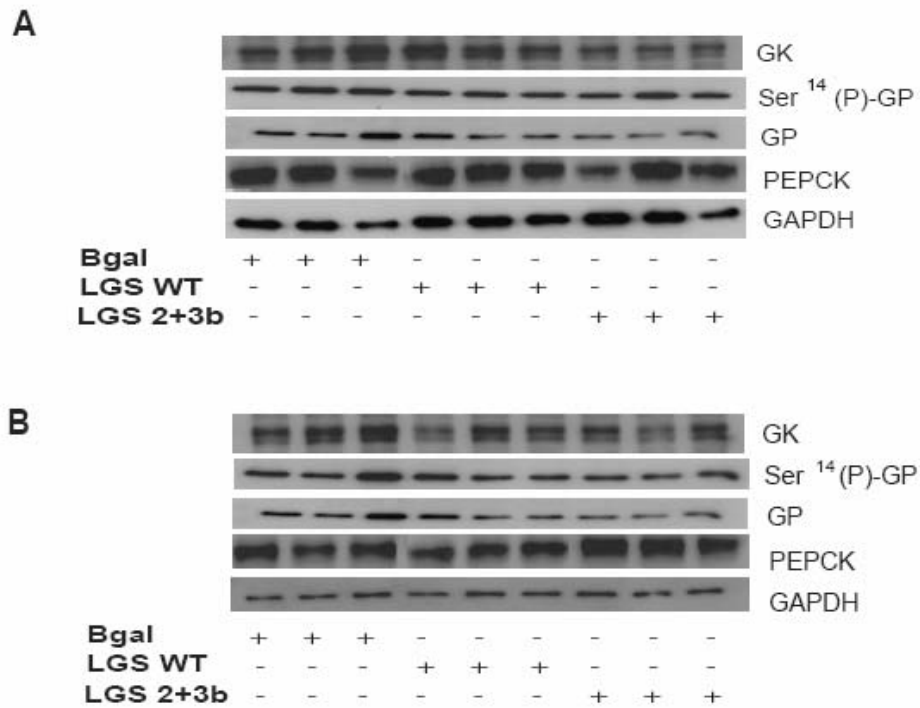
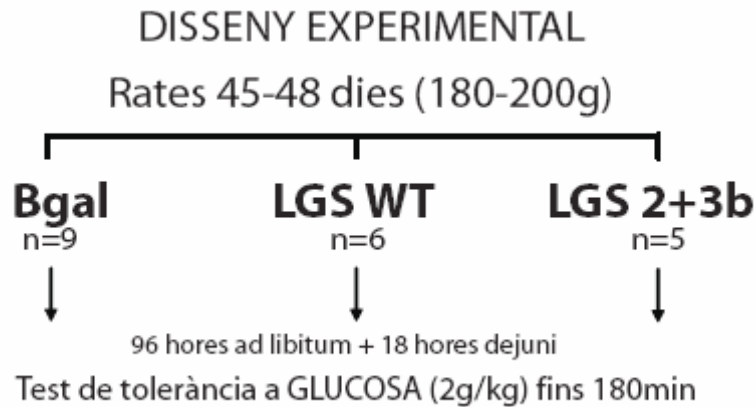


Fig.10 Quantificació de les proteïnes GK, GP o PEPCK per Western blot. Anàlisi representatiu dels homogenats de tres extractes de fetge dels grups de rates dejunades (**A**) o alimentades (**B**) durant les 18 hores finals de l'experiment que havien estat injectades amb la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b amb anticossos contra la glucoquinasa (GK), la glicogen fosforilasa fosforilada en la serina 14 (Ser14(P)GP), la glicogen fosforilasa total (GP) i la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK). Com a control de càrrega s'ha usat un anticòs contra la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH). En tots els casos s'han analitzat 20 µg de proteïna per carril.

2.3 Test de tolerància a la glucosa

Es va realitzar un test de tolerància a glucosa, per avaluar la capacitat dels animals que sobreexpressaven la LGS 2+3b per mobilitzar un excés de glucosa en sang. Es va injectar nous grups de rates amb preparacions d'adenovirus que codificaven per la LGS 2+3b, la LGS WT o la Bgal per vena caudal en rata (*Esquema Disseny Experimental*). Passades 96 hores des de la injecció dels adenovirus, els animals es van dejunar durant 18 hores, tot permetent accés a l'aigua de beguda. Després del dejuni es va administrar una solució de glucosa de 2 g / kg pes via peritoneu, i es procedí a fer el seguiment de la glicèmia dels animals injectats.



2.3.1 Glicèmia en test tolerància glucosa

Com s'observa a la *Figura 11*, els animals que sobreexpressaven la LGS 2+3b en fetge presentaven una millora en la corba de tolerància a la glucosa respecte els animals que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT. De fet, els animals que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT presentaven un pic de 320mg/dl aproximadament 15 minuts després de l'administració de la solució de glucosa, i la glicèmia retornà a valors basals als 150-180 minuts de post-administració. En canvi, les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven un pic de 175mg/dl als 15 minuts de la injecció. La glicèmia de les rates que

sobreexpressaven la LGS 2+3b continuà per sota de la resta d'animals, fins que retornà a valors indistingibles dels de la resta de grups en el minut 180.

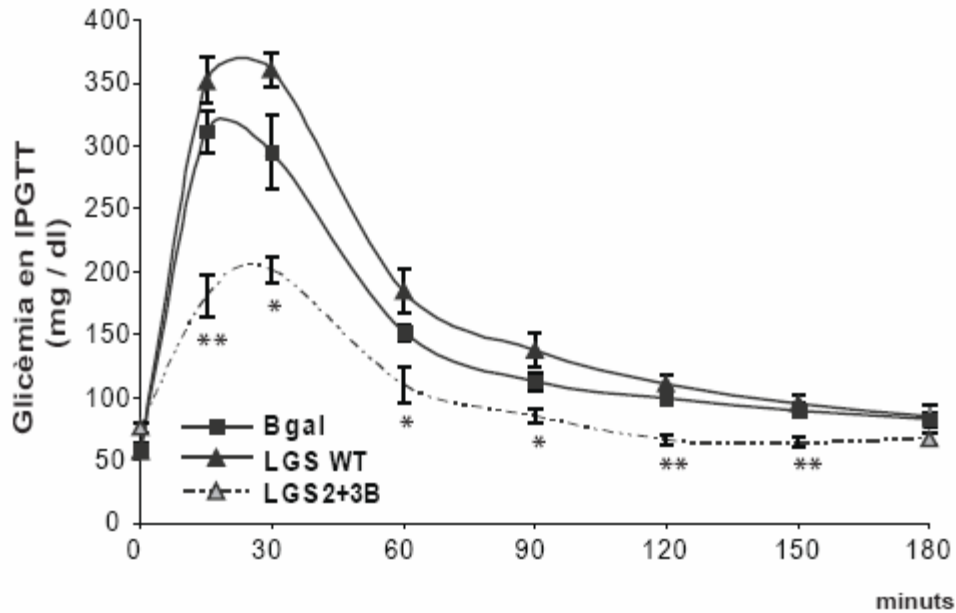


Fig.11 Corbes de tolerància a la glucosa. La glicèmia es va mesurar per sang extreta de la cua dels animals i cada punt representa la mitjana \pm S.E.M de 9 rates que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa en els valors de glicèmia de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b en el temps mesurat respecte a les rates que sobreexpressaven la Bgal amb * $p < 0,05$ i * $p < 0,005$ respectivament.

2.3.2 Concentració plasmàtica d'insulina, triglicèrids, lactat i cossos cetònics a punt final de test de tolerància a glucosa

Es van mesurar una sèrie de paràmetres plasmàtics indicatius de l'estat metabòlic al finalitzar l'experiment, és a dir passats 180 minuts de la injecció de la solució de glucosa, temps en el que es va procedir al sacrifici dels animals. La insulinèmia calculada al final del tractament en el grup de rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b era semblant a la de les rates que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT (**Taula 5**). La concentració de triglicèrids i lactat plasmàtics era similar en tots els grups analitzats. Finalment,

s'observava una disminució en la concentració de l'àcid β -hidroxibutíric BHBA, en les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b (**Punt 2.5**).

| | Bgal | LGS WT | LGS 2+3b |
|-----------------------------|-------------|---------------|-------------------------------|
| Insulinèmia (ng/ml) | 2,3 \pm 1 | 2,7 \pm 0.7 | 2,8 \pm 1 |
| Triglicèrids (mg/dl) | 52 \pm 10 | 47 \pm 14 | 63 \pm 8 |
| Lactat (mg/dl) | 27 \pm 7 | 35 \pm 3 | 40 \pm 11 |
| BHBA (mg/dl) | 11 \pm 2 | 13 \pm 1 | 4 \pm 1 * |

Taula 6. Concentració plasmàtica d'insulina, triglicèrids, lactat i àcid β -hidroxibutíric al punt final del test de tolerància a glucosa. Els resultats s'han expressat com la mitjana \pm SEM de 9 rates sobreexpressaven la Bgal, 6 rates que sobreexpressaven la LGS WT, i 5 rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb * $p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates que expressen la Bgal en el mateix estat metabòlic.

2.3.3 Quantificació de glicogen en fetge punt final del test de tolerància

Es mesurà la quantitat de glicogen acumulat en fetge a punt final del test de tolerància a glucosa, per determinar si la millora en la tolerància de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b es corresponia amb un augment en l'acumulació del polisacàrid en el fetge.

La sobreexpressió de la LGS 2+3b produïa un augment en l'emmagatzematge de glicogen hepàtic respecte a les rates control (**Fig. 12A**). De fet, els valors determinats deuen d'ésser el resultat de la suma del glicogen sintetitzat a partir de la glucosa administrada intraperitonealment i el glicogen que encara no havia estat mobilitzat durant el dejuni de 18 hores previ al test de tolerància.

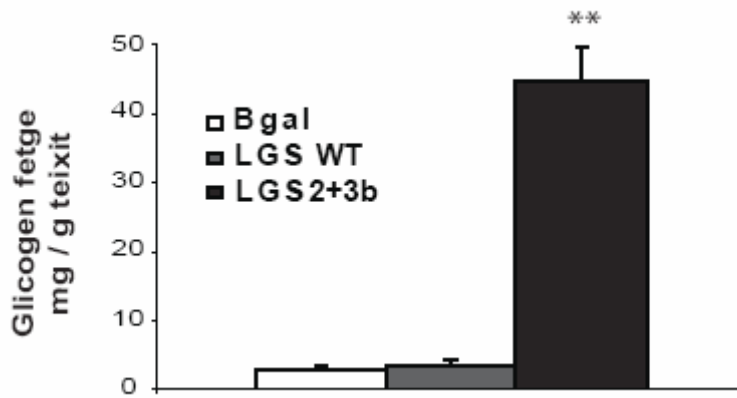


Fig.12 Mesura del glicogen acumulat a punt final del test de tolerància a glucosa. Anàlisi del contingut de glicogen acumulat al punt final de l'experiment, en fetge de les rates que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b expressat en mg per g de teixit. Els valors representen la

mitjana \pm S.E.M de 9 rates que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates que sobreexpressaven LGS WT, i 5 rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb * $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates que expressen la Bgal en el mateix estat metabòlic.

2.3.4 Localització de la LGS 2+3b *in vivo*

La LGS transloca del citoplasma al còrtex cel·lular en resposta a glucosa en hepatòcits, com es comentà prèviament (Fernandez-Novell, Bellido et al. 1997; Garcia-Rocha, Roca et al. 2001). Es va estudiar doncs si els hepatòcits de les rates que estaven sobreexpressant la LGS 2+3b presentaven l'enzim sobreexpressat acumulat en la perifèria cel·lular. A tal fi, es va procedir a fer seccions ultrafines del fetge de les rates sacrificades a punt final de l'experiment, i es va fer una immunofluorescència usant l'anticòs que reconeix la LGS (**Fig 13**). La senyal del teixit de les rates que sobreexpressaven la Bgal, ens va servir per adaptar la intensitat del làser del microscopi confocal per tal de no detectar la LGS endògena. Les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven l'enzim acumulat a la perifèria cel·lular, amb un patró semblant al que presenta l'enzim endogen en presència d'alta glucosa. En el cas de les rates que sobreexpressaven la LGS WT aquesta translocació no era tan evident, possiblement degut a la menor síntesi de glicogen respecte al grup de rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b.

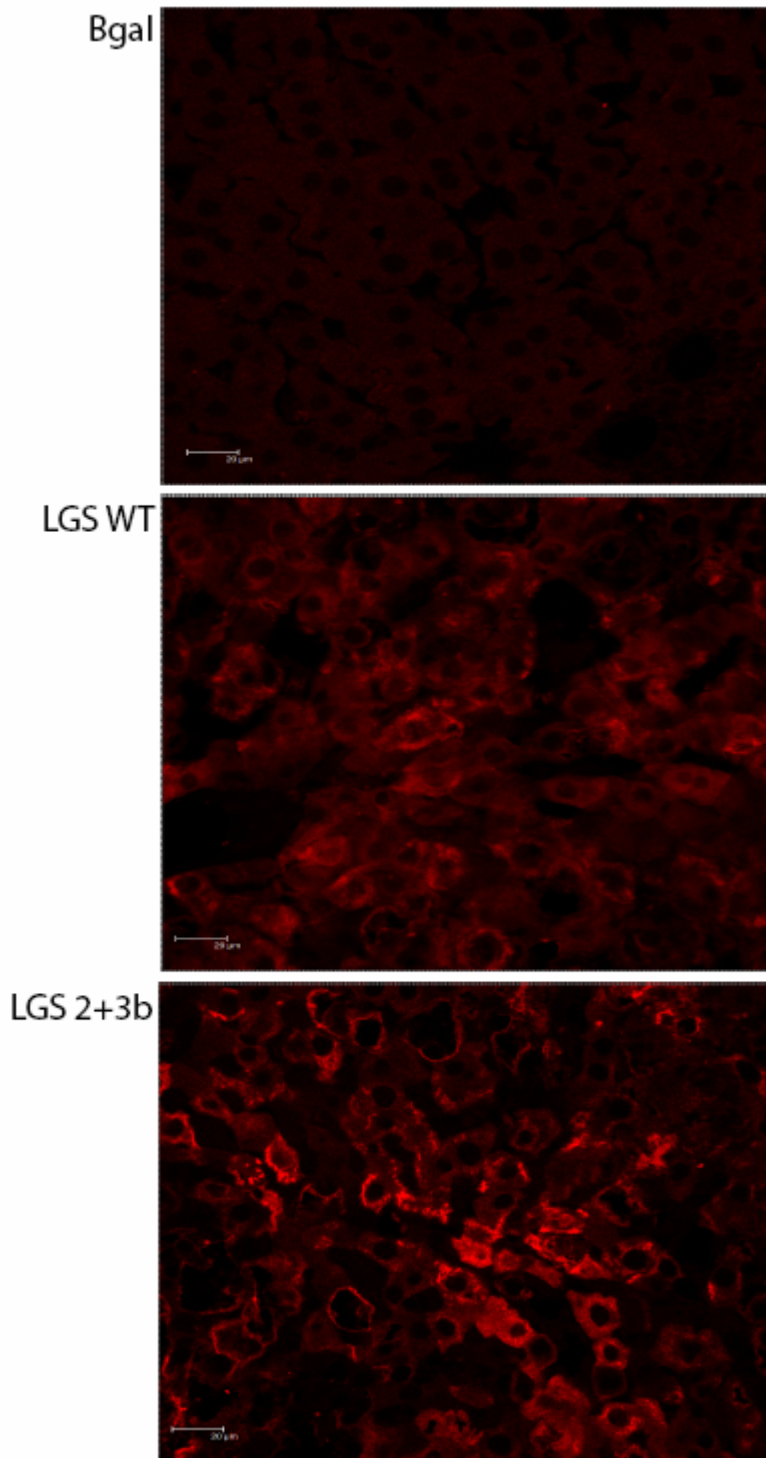


Fig.13 *Detecció per immunofluorescència de la LGS en el fetge a punt final del test de tolerància a glucosa. Les biòpsies de fetge de les rates després del test de tolerància a glucosa van estar processades tal i com es descriu en l'apartat de material i mètodes, per a fer una immunofluorescència amb un anticòs contra la LGS. Imatges representatives de microscòpia confocal de les rates que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b. La intensitat del làser va ésser ajustada per a no detectar la senyal de la LGS endògena (la dels animals que sobreexpressaven la Bgal). Les imatges van ésser obtingudes usant un microscopi confocal amb objectiu 63x (Plan Apo 63x Na 1,4 oil). L'escala representa 20 µm.*

2.4 Discussió

Nombrosos estudis suggereixen un vincle entre un increment en l'activitat de la LGS i una millora en la homeòstasi de la glucosa (Magnusson, Rothman et al. 1992; Cline, Rothman et al. 1994; Velho, Petersen et al. 1996), tot i que no hi ha descrita cap evidència directa. A fi d'estudiar aquesta possible relació es va decidir sobreexpressar una LGS constitutivament activa (LGS 2+3b) en fetge de rata mitjançant la infusió d'adenovirus purificats per vena caudal.

Els resultats mostren que la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b en rata sana produïa un increment en la deposició de glicogen en aquest òrgan. Aquest increment podia contribuir a la baixada en la glicèmia que es produïa en les rates, sense evidències d'arribar a un estat d'hipoglucèmia. Les rates que sobreexpressaven la mateixa quantitat de proteïna LGS però en la forma *wild type* no van mostrar cap increment en la quantitat de glicogen hepàtic ni tampoc una disminució en la glicèmia. De fet, la concentració catalítica d'activitat GS mesurada en aquest últim grup indicava que el sistema és capaç d'inactivar gairebé tot l'enzim sobreexpressat, pel que la sobreexpressió de l'enzim en la forma salvatge resulta inefectiva en la millora de l'homeòstasi de la glucosa.

Un dels resultats clau d'aquest estudi és que tot i que s'expressin una quantitat similar de proteïna LGS WT o de la forma de LGS modificada en els llocs 2 i 3b, només aquesta última és capaç de produir una millora en la tolerància a la glucosa. Això pot ésser explicat gairebé en la seva totalitat, pel prominent augment en l'emmagatzematge de glicogen hepàtic en el darrer grup, de fet la LGS 2+3b sobreexpressada era a la perifèria cel·lular, el que és indicatiu de síntesi de glicogen (Fernandez-Novell, Bellido et al. 1997; Garcia-Rocha, Roca et al. 2001). El glicogen acumulat en les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b probablement ja era major respecte als altres grups de rates després del dejuni de 18 hores previ a la realització del test de tolerància a glucosa, com passava amb el grup de rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b dejunades durant 18 hores. Per tant, aquest romanent de glicogen no semblava limitar la capacitat d'acumulació posterior del

polisacàrid en fetge, amb el que les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b podien eliminar l'excés de glucosa en sang més ràpidament que la resta d'animals dirigint-la a síntesi de glicogen.

Està descrit que la sobreexpressió de la PTG en fetge de rates sanes (O'Doherty, Jensen et al. 2000) o la G_L en fetge de rata sota dieta grassa (Gasa, Clark et al. 2002) o en un model de rata diabètica tipus I STZ (Yang and Newgard 2003) produeix un augment prominent en la quantitat de glicogen hepàtic, però quan els animals son sotmesos a dejuni aquest glicogen no pot ésser mobilitzat, tot i que la glicogenòlisis es troba estimulada en el dejuni com a conseqüència d'un increment en el glucagó circulant (Unger 1981). En canvi, les rates que sobreexpressaven LGS 2+3b, tot i acumular grans quantitats de glicogen hepàtic quan romanien alimentades *ad libitum*, eren capaces de mobilitzar el polisacàrid acumulat en resposta a un dejuni de 18 hores. Aquest resultat seria semblant al que s'observa amb la sobreexpressió hepàtica d'una forma truncada de les subunitats de la PP1 G_L i G_M anomenada $G_M\Delta C$ en rata sota dieta grassa (Gasa, Clark et al. 2002; Yang, Cao et al. 2002). Tanmateix, les cèl·lules que sobreexpressen la PTG o la G_L responen menys a forskolina que les que expressen la $G_M\Delta C$ (Yang, Cao et al. 2002). Aquesta droga activa la PKA, el que produeix l'activació de la PhK mitjançant fosforilació, el que conseqüentment produeix la fosforilació i per tant activació de la GP. Els animals que sobreexpressaven la LGS 2+3b tant en l'estat de dejuni com en alimentació *ad libitum* no presentaven cap canvi en l'expressió de la GP hepàtica o en l'activació d'aquesta respecte als altres grups de rates. Conseqüentment, és més probable que els nostres resultats i els descrits per la sobreexpressió de la $G_M\Delta C$ indiquin que la GP hepàtica encara pot romandre activa. Aquests resultats obtinguts en les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b o la LGS WT eren similars als descrits prèviament mitjançant cultiu d'hepatòcits, en els que un increment de la LGS WT mitjançant la infecció amb adenovirus no produïa cap canvi en la quantitat de GP hepàtica (Gomis, Ferrer et al. 2000). No obstant això, els resultats són diferents dels que s'han descrit per al ratolí transgènic que sobreexpressa la MGS constitutivament activa en múscul esquelètic, on aquesta sobreexpressió causa un augment en la quantitat de GP muscular (Manchester, Skurat et al. 1996). A més, la sobreexpressió de GP muscular en cultius de múscul

esquelètic humà també produeix un increment en la quantitat de MGS (Baque, Guinovart et al. 1996). Potser MGS i GP muscular estan controlats de manera recíproca en el múscul, el que no passaria en el fetge segons els nostres resultats.

L'estratègia aquí presentada per a produir una millora de l'homeòstasi de glucosa es basà en l'estimulació de la conversió de l'excés de glucosa en glicogen, evitant l'entrada en la via glicolítica. De fet, un augment del flux en la via glicolítica és la raó per la qual estratègies com la sobreexpressió de la GK en fetge de rata, produeix un increment de triglicèrids, àcids grassos lliures i lactat circulants tot i resultar ésser efectiva en la disminució de la glicèmia (O'Doherty, Lehman et al. 1999). Aquest increment en lípids circulants és un efecte a evitar doncs podria conduir a l'empitjorament de la hiperlipidèmia associada de la diabetis tipus II. Degut a l'estratègia de l'aproximació descrita en aquesta tesi doctoral, la disminució de la glicèmia de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b no estava acompanyada per cap increment en la concentració de triglicèrids circulants. A més, els resultats demostren que l'únic paràmetre plasmàtic analitzat que variava per la sobreexpressió de la LGS 2+3b era la concentració d'àcid β -hidroxibutíric en resposta a un dejuni de 18 hores. La síntesi de cossos cetònics ocorre quan es mobilitzen les reserves de triglicèrids, però gràcies a la gran quantitat de glicogen emmagatzemat en les rates LGS 2+3b es produeix una menor mobilització de triglicèrids. De fet, en diabetis l'augment en la síntesi de cossos cetònics a partir dels triglicèrids mobilitzats pot conduir a l'acidosi cetònica, pel que es suggereix que la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b podria evitar aquest augment.

Quan es produeix un desequilibri entre l'activitat GS i l'activitat BE, el glicogen no es ramifica correctament el que condueix a l'acumulació de cossos de poliglucosà (Raben, Danon et al. 2001; Pederson, Csitkovits et al. 2003; Vilchez, Ros et al. 2007). Així, hi havia la possibilitat de que les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentessin una baixa ramificació del glicogen i formessin cossos de poliglucosà al fetge. L'anàlisi mitjançant microscòpia electrònica de les biòpsies dels fetges de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b que havien restat alimentades establí que no s'havia produït cap alteració en l'ultraestructura cel·lular deguda a la sobreexpressió. Així

mateix, quan analitzàvem el grau de ramificació del glicogen hepàtic d'aquest grup de rates, observàvem que aquest era semblant al dels altres dos grups de rates en el mateix estat metabòlic. Altres estudis demostren que quan hi ha una poca ramificació del glicogen es produeix una diferència major de l'absorció respecte als controls (Vilchez, Ros et al. 2007). Tot i això, estudis a més llarg termini mitjançant d'altres estratègies com la generació d'animals transgènics per a la LGS 2+3b en fetge permetran aclarir aquest punt.

En conclusió, en aquest capítol es determina que la sobreexpressió de la LGS 2+3b en fetge de rata sana és capaç de produir una millora en la homeòstasi de la glucosa. Per tal de completar la nostra investigació sobre les propietats de la LGS 2+3b i el seu potencial com a estratègia per la millora d'estats on aquesta homeòstasi es troba alterada, es necessari estendre l'estudi en models diabètics.