



Fundació
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM
Diabetis i Obesitat



TERÀPIA GÈNICA COMBINADA PER CORREGIR L'ESTRÈS OXIDATIU I DE RETICLE EN LA NEUROPATIA DIABÈTICA DE TIPUS 2

Miguel Chillón Rodríguez

Institut de Neurociències – Universitat Autònoma de Barcelona

1. Resum

Objectius

L'objectiu principal del projecte és avançar en el coneixement dels mecanismes que porten al desenvolupament de la neuropatia diabètica de tipus 2, amb especial èmfasi en la participació de l'estrès de reticle endoplasmàtic i l'estrès oxidatiu. L'objectiu final és dissenyar una estratègia terapèutica combinada amb eines de teràpia gènica que podrien conduir a un tractament específic i eficient per a aquesta complicació de la diabetis.

Aquest objectiu general es divideix en els objectius específics següents:

1. Fer una caracterització funcional de la neuropatia diabètica en animals amb diabetis de tipus 2.
2. Investigar els mecanismes moleculars que porten al desenvolupament de la neuropatia diabètica mitjançant l'ús d'una estratègia de proteòmica en el nervi perifèric i en els ganglis de l'arrel dorsal d'animals amb diabetis de tipus 2.
3. Validar els canvis d'expressió de marcadors relacionats amb estrès de reticle i estrès oxidatiu *in vitro* i *in vivo* a curt i llarg termini.
4. Promoure el tractament antioxidant, antiinflamatori i neuroprotector en ratolins diabètics mitjançant teràpia gènica utilitzant proteïnes clau en l'estrès oxidatiu o de reticle com klotho o BiP i estudiar el potencial terapèutic de la sobreexpressió neuronal específica d'aquests factors mitjançant l'administració intratecal de vectors AAV.

Disseny i metodologia

Es proposa utilitzar el model de ratolí DbDb, que té una mutació en el receptor de la leptina i presenta les característiques típiques de la diabetis de tipus 2. La neuropatia diabètica en aquests animals es monitoritzarà per estudis funcionals mitjançant estudis de conducció nerviosa motora i sensorial i també mitjançant estudis de sensibilitat al dolor i la temperatura i estudis de sudoració. A més a més, els estudis histològics s'utilitzaran per quantificar la innervació intraepidèrmica i les glàndules sudorícoles. Les anàlisis moleculars permetran estudiar les vies de senyalització cel·lulars afectades, com l'estrès de reticle o oxidatiu. Les anàlisis morfomètriques dels nervis tibials dels animals diabètics i controls ens permetran determinar el nivell de mielinització i de degeneració axonal d'aquests ratolins.

Per investigar els mecanismes moleculars que porten al desenvolupament de la neuropatia diabètica, es proposa un estudi de proteòmica per caracteritzar la resposta UPR i l'estrès oxidatiu en nervi ciàtic i ganglis de l'arrel dorsal.

Aquests resultats es validaran mitjançant anàlisi de PCR quantitativa i transferència de proteïnes (*Western blot*) en línies cel·lulars de cèl·lules de Schwann o neurones sensorials i en teixits de sistema nerviós perifèric dels ratolins diabètics per identificar la millor diana terapèutica.

Finalment, proposem una estratègia de teràpia gènica per neuropatia diabètica utilitzant vectors AAV combinant l'acció contra l'estrès oxidatiu i l'estrès de reticle endoplasmàtic.

Pla de treball

- Caracterització funcional de la neuropatia diabètica en animals amb diabetis de tipus 2 per determinar l'edat adequada per als estudis de proteòmica.
- Estudi de proteòmica en el nervi ciàtic i en els ganglis de l'arrel dorsal de ratolins amb diabetis de tipus 2.
- Validació dels resultats de proteòmica *in vitro*, en línies cel·lulars de cèl·lules de Schwann i ganglis de l'arrel dorsal, i *in vivo*, en nervi ciàtic i DRG en diferents moments de la diabetis.
- Teràpia gènica mitjançant l'administració intratecal de vectors AAV que permetin la sobreexpressió neuronal de proteïnes clau amb efecte antioxidant, antiinflamatori i neuroprotector.

2. Resultats

Caracterització funcional de la neuropatia diabètica en animals amb diabetis de tipus 2 per determinar l'edat adequada per als estudis de proteòmica

Per començar l'estudi es va voler determinar l'inici dels canvis funcionals en l'SNP del model ratolí de diabetis de tipus 2 per establir quina era la millor edat per detectar canvis en els estudis de proteòmica i també tenir una base de cara a les anàlisis més rellevants, un cop els animals hagin estat tractats amb els vectors terapèutics.

Es van dur a terme estudis funcionals, com algesimetries per detectar la sensibilitat al dolor, estudis electrofisiològics per valorar la capacitat de conducció nerviosa i assaigs de sudoració, que indiquen el grau d'innervació de les glàndules sudorípares. Les anàlisis immunohistoquímiques van permetre quantificar el nombre de fibres nervioses intraepidèrmiques i, finalment, l'estudi morfològic dels nervis tibials servia per determinar el nivell de mielinització o degeneració axonal d'aquests ratolins.

En conjunt, aquest estudi exhaustiu de diferents factors implicats en la caracterització de la neuropatia diabètica ens indiquen que al cap de 13-15 setmanes de diabetis els ratolins DbDb ja presenten la patologia, motiu pel qual vam decidir escollir aquesta edat per començar els estudis de proteòmica. D'altra banda, l'elevada variabilitat entre grups d'animals va demostrar que sempre necessitem un grup de control del model animal no tractat per comparar les dades de teràpia gènica.

Estudi de proteòmica en el nervi ciàtic i en els ganglis de l'arrel dorsal de ratolins amb diabetis de tipus 2

Hem fet estudis de proteòmica de dos teixits directament implicats en la neuropatia diabètica, els ganglis de l'arrel dorsal (DRG) i nervi ciàtic per separat, mitjançant marcatge massiu en tàndem (TMT) i anàlisi per cromatografia líquida amb espectrometria de masses (LC/MS/MS) per comprendre millor el mecanisme d'acció de la malaltia i dilucidar noves dianes per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques avançades. L'estudi s'ha dut a terme comparant animals diabètics al cap de 13-15 setmanes de diabetis amb el seus controls, ja que aquesta edat correspon a l'inici dels canvis funcionals que són indicadors de neuropatia diabètica en el model murí. L'anàlisi proteòmica ens ha permès obtenir clústers funcionals mitjançant diferents algorismes que conclouen que el sistema nerviós perifèric dels ratolins amb diabetis de tipus 2 presenta una desregulació del metabolisme de la glucosa i dels lípids; anomalies en proteïnes estructurals, incloses proteïnes relacionades amb el citoesquelet; una desregulació de xaperones moleculars, relacionades amb el plegament de les proteïnes i que podrien causar un augment de l'estrès de reticle; alteracions de les proteïnes relacionades amb l'estrès oxidatiu, com el glutatió o les peroxiredoxines, i un augment de les proteïnes inflammatòries i de resposta en fase aguda, que podrien aportar protecció envers la inflamació i l'estrès oxidatiu. Algunes vies s'han trobat

diferencialment modificades en DRG i nervi ciàtic, com la maquinària cel·lular de translació gènica, que segurament està directament relacionada amb la depleció d'energia en DRG i on també hem vist més augment d'enzims antioxidants, fet que suggereix que les neurones sensorials experimentarien una resposta més important davant l'estrès que no el nervi ciàtic. Una de les proteïnes més alterades que hem trobat és la proteïna MUP, que es troba extremament disminuïda en aquests teixits i aquesta reducció es correlaciona amb la progressió de la diabetis. MUP es troba situada a la matriu extracel·lular i podria estar relacionada amb la seva degradació, present en altres malalties inflamatòries i neurològiques, per la qual cosa molt probablement apuntaria a una nova funció d'aquesta proteïna. Els nostres estudis continuen en aquest sentit.

Validació dels resultats de proteòmica *in vitro*, en línies cel·lulars de cèl·lules de Schwann i ganglis de l'arrel dorsal, i *in vivo*, en nervi ciàtic i DRG en diferents moments de la diabetis

Hem dut a terme estudis en línies cel·lulars de cèl·lules de Schwann i ganglis de l'arrel dorsal per confirmar que les proteïnes alterades en els estudis de proteòmica també ho estaven a escala cel·lular. També hem estudiat a fons l'estrès de reticle i l'estrès oxidatiu, i hem confirmat la nostra hipòtesi. *In vivo*, en nervis ciàtics i DRG de ratolins amb diabetis de tipus 2, els resultats són menys clars, però també tendeixen a suggerir un augment de l'alteració d'aquestes dues vies a mesura que s'allarga el temps de diabetis i apareix la neuropatia. En els estudis *in vivo*, hem pogut confirmar les dades de proteòmica per diverses proteïnes alterades, de manera que hem validat les dades obtingudes i el mecanismes moleculars de desenvolupament de la neuropatia, tal com s'explica en l'apartat anterior.

Teràpia gènica mitjançant l'administració intratecal de vectors AAV que permetin la sobreexpressió neuronal de proteïnes clau amb efecte antioxidant, antiinflamatori i neuroprotector

Primerament vam seleccionar AAVrh10 entre diversos serotips d'AAV testats per via intratecal i intravenosa com el més eficient a l'hora de transduir el sistema nerviós perifèric. Vam administrar vectors AAV sobreexpressant la proteïna BiP, una xaperona relacionada amb estrès de reticle, i klotho, una proteïna protectora de l'estrès oxidatiu, per via intratecal en el model de diabetis, però malauradament

no vam veure canvis en el desenvolupament i la progressió de la neuropatia diabètica.

Per aquest motiu, no hem fet la doble teràpia amb BiP i klotho, tal com havíem plantejat, sinó que l'hem substituït per una altra molècula, la neuregulina 1 (Nrg1), que havíem utilitzat prèviament amb èxit en un model d'esclerosi lateral amiotròfica, el ratolí transgènic SOD1G93A. La Nrg1 és una proteïna implicada en la protecció contra l'estrès oxidatiu i l'estrès de reticle, a banda de ser neuroprotectora i estimular la mielinització, tant del sistema nerviós central com del perifèric, mitjançant la inducció de factors de transcripció implicats en la mielinització. La sobreexpressió de l'Nrg1 de tipus III mitjançant vectors AAVrh10 en ratolins diabètics va permetre millorar la neuropatia diabètica. Els estudis electrofisiològics van mostrar una millora en les proves de conducció motora i sensorial en comparació amb els animals diabètics no tractats i es va correlacionar amb una disminució del nombre d'axons degenerats i fibres mielinitzants de diàmetre més gran. A més, la recuperació de l'expressió d'Nrg1-III i el seu receptor ErbB va conduir a una senyalització cel·lular normalitzada i va restaurar els nivells de proteïnes de mielina i factors de transcripció mielinitzants.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

La diabetis *mellitus* s'ha convertit en un dels problemes sanitaris més greus del nostre temps. Les estimacions indiquen que l'any 2030 la seva prevalença arribarà a proporcions epidèmiques i afectarà 439 milions de persones a tot el món. Actualment ja afecta més del 6,5% de la població mundial. Aquest serà un desafiament sense precedents per a les pròximes generacions, amb profunds impactes socials, econòmics i de salut. Les complicacions de la diabetis són la causa principal de discapacitat, disminució d'esperança de vida i costos econòmics relacionats amb la diabetis. La complicació més comuna i debilitant de la diabetis és la neuropatia diabètica, que afecta tant components sensoriomotors com autònoms del sistema nerviós perifèric (SNP); la desenvolupen entre el 60 i el 70% dels pacients i és la complicació de la diabetis que ocasiona la major part d'hospitalitzacions. La polineuropatia sensoriomotora que es desenvolupa en pacients diabètics és la neuropatia perifèrica més comú i pot afectar tots els tipus de fibres nervioses. La percepció sensorial

anormal dels pacients diabètics inclou pèrdua de la sensació de dolor i temperatura, així com sensació de cremor i hiperestèsia cutània, que afecta inicialment els peus i la part inferior de les cames i més tard les mans i els braços. En estadis més avançats, apareixen úlceres als peus i deformitat neuropàtica, que finalment ocasiona el 40 % de les amputacions no traumàtiques de les extremitats.

Els resultats del nostre projecte ens han ajudat a comprendre més bé la malaltia per dilucidar noves dianes i dissenyar estratègies terapèutiques avançades, basades en el mecanisme d'acció de la malaltia. Encara estem estudiant el paper de MUP en el sistema nerviós central, però els resultats de la teràpia gènica amb Nrg1-III en el model de ratolí amb neuropatia diabètica són esperançadors, malgrat que encara calen estudis abans d'arribar a la clínica.

4. Bibliografia científica generada

Publicacions

Leal-Julià M, Vilches J, Onieva A, Verdés S, Sánchez A, Chillon M, Navarro X, Bosch A.

Proteomic quantitative study of dorsal root ganglia and sciatic nerve in type 2 diabetic mice.

En revisió a *Diabetes*.

Kagiava A, Richter J, Leal-Julià M, Tryfonos C, Sargiannidou I, Christodoulou C, Bosch A, Kleopa KA.

Efficacy of AAV Serotypes to target Schwann cells after intrathecal and intravenous delivery.

Enviat a *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*.

Ariza L, Leal-Julià M, García-Lareu B, Sánchez A, Pagès G, Homs J, Carretero A, Ruberte J, Chillón M, Corfas G, Navarro X, Bosch A.

Downregulation of Nrg1 type III signaling is an early event in murine diabetic neuropathy.

Enviat a *Neurobiology of Disease*.

Leiva-Rodríguez T, Romeo-Guitart D, Herrando-Grebuloza M, Muñoz-Guardiola P, Polo M, Bañuls C, Petegnief V, Bosch A, Lizcano JM, Apostolova N, Forés J, Casas C.

GRP78/BiP overexpression triggers PINKK1/IP3R-mediated neuroprotective mitophagy.

Experimental Neurology (en premsa).

Comunicacions a congressos

Leal-Julià M, Pagès G, Casas C, Chillón M, Bosch A.

Characterizing in vitro models of type 2 diabetic peripheral neuropathy.

Pòster.

2017 Peripheral Nerve Society Annual Meeting.

Publicació: *Journal of Peripheral Nervous System*.

Lloc de celebració: Sitges, Barcelona.

Data: Juliol, 2017.

Leal-Julià M, Vilches J, Navarro X, Chillón M, Bosch A.

Proteomic quantitative study of dorsal root ganglia and sciatic nerve in type 2 diabetic mice.

Pòster.

XI Simposi de Neurobiologia, Societat Catalana de Biologia.

Lloc de celebració: Barcelona.

Data: Novembre, 2018.

Tesis doctorals

Marc Leal Julià

Proteomic study of dorsal root ganglia and sciatic nerve in type 2 diabetic mice.

Programa de doctorat en Neurociències, UAB.

Beca 2017 FI_B 00434, Direcció General de Recerca, Generalitat de Catalunya.

Defensa prevista per a l'octubre del 2021.