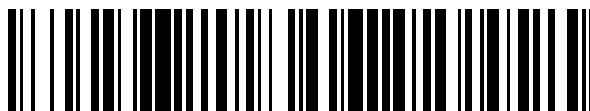


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 465**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2013 PCT/EP2013/069181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14048788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2013 E 13763241 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2900820**

54 Título: **Métodos para producir una población de células beta pancreáticas**

30 Prioridad:

**27.09.2012 EP 12306172**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.05.2018**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)  
101 Rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%) y  
UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**COLLOMBAT, PATRICK;  
AL-HASANI, KEITH;  
COURTNEY, MONICA;  
BEN-OHTMAN, NOUHA;  
GJERNERS, ELISABET y  
MANSOURI, AHMED**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 666 465 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para producir una población de células beta pancreáticas

**Campo de la invención:**

5 La presente invención se refiere a un método *ex vivo* para la producción de células beta pancreáticas, así como a métodos para el cribado de compuestos que inducen un fenotipo de células beta pancreáticas. La presente invención también se refiere a un método para la inducción de la conversión de células alfa pancreáticas en células beta pancreáticas en un paciente que lo necesita.

**Antecedentes de la invención:**

10 Los páncreas está compuesto de dos compartimentos morfológicamente diferentes: células exocrinas, que abarcan las células acinares y ductales, y el tejido endocrino (revisado en Slack, 1995). El compartimento endocrino representa menos del 2% del órgano, y consiste en cinco tipos de células que sintetizan hormonas: las células  $\beta$  que secretan insulina, las células  $\alpha$  que secretan glucagón, las células  $\delta$  que secretan somatostatina, las células PP que secretan polipéptido pancreático, y las células  $\epsilon$  que secretan grelina. Estas células endocrinas están organizadas en unidades funcionales muy vascularizadas denominadas islotes de Langerhans, que están implicados en la homeostasis de la glucosa. El desarrollo pancreático corresponde a un proceso elaborado de sucesos morfológicos acompañados por un patrón complejo de diferenciación celular y selección de linaje. Estos sucesos están mediados en gran parte por interacciones tisulares, rutas de señalización y cascadas dirigidas de la expresión génica, que determinan el destino de las células. Así, Pdx1 desempeña un papel crucial en el desarrollo temprano del páncreas: la eliminación de PDX1 mediante selección génica detiene el desarrollo pancreático tras la formación del brote inicial. La especificación de las células endocrinas en el endodermo pancreático en desarrollo depende de una señalización Notch adecuada y la expresión del factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico (bHLH) pro-endocrino neurogenina 3 (Ngn3), un miembro de la familia de neurogenina/neuroD de genes proneuronales. La asignación del destino de las células endocrinas depende en gran medida de la interacción entre los factores de transcripción Arx y Pax4. Se demostró que estos exhiben actividades antagonistas en los procesos subyacentes en la especificación de los destinos de los subtipos endocrinos por medio de un circuito regulatorio inhibitorio que controla el estado transcripcional de estos dos genes (Collombat et al., 2005). Se descubrió que la expresión de Arx se incrementó en ausencia de un alelo funcional de Pax4, y viceversa (aumento del contenido de transcrito de Pax4 en mutantes de Arx), lo que sugiere que la especificación endocrina normal requiere la prevalencia de cualquiera de los dos factores para especificar un subtipo de célula endocrina particular; si predomina Pax4, se especificarán los destinos de células  $\beta$  y  $\delta$ , mientras Arx favorecerá la vía de células  $\alpha$ . Por último, se descubrió que Arx y Pax4 inhiben mutuamente la transcripción entre sí por medio de una interacción física directa con el promotor pertinente (Collombat et al., 2005). La expresión persistente de Arx en las células precursoras tempranas pancreáticas y/o endocrinas durante el desarrollo embrionario dio como resultado una reducción drástica del número de células  $\beta$  y  $\delta$ , de manera concurrente con un incremento de las poblaciones de células  $\alpha$  y PP (Collombat et al., 2007). Estos resultados indicaron que Arx, por tanto, es suficiente para estimular los linajes  $\alpha$  y PP durante la morfogénesis del páncreas. De manera más interesante, se descubrió que la expresión anormal de Arx en las células  $\beta$  adultas indujo su conversión en células que exhibían características de células  $\alpha$  o PP (Collombat et al., 2007). Este descubrimiento tuvo una importancia fundamental en el contexto de la terapia basada en células  $\beta$ , ya que implicó que se podría conseguir la conversión complementaria, es decir, generar células  $\beta$  a partir de células endocrinas alternativas. Por lo tanto, la expresión ectópica de Pax4 en el páncreas de ratón en desarrollo dio como resultado islotes sobredimensionados compuestos principalmente de células que expresaban un fenotipo de células  $\beta$  (Collombat et al., 2009), lo que indica que la expresión anormal de Pax4 es suficiente para estimular la asignación del linaje de células  $\beta$  durante el desarrollo. De manera importante, la expresión anormal de Pax4 en células que expresaban glucagón, acoplada con el marcaje genético para observar sus consecuencias, dio como resultado una pérdida de células  $\alpha$  de manera concurrente con un incremento drástico del número de células productoras de insulina. Los experimentos de seguimiento del linaje demostraron una conversión de las células positivas para glucagón en células que expresaban insulina. Además, las células que expresaban insulina recién generadas mostraron la mayoría de las características de las verdaderas células  $\beta$  (Collombat et al., 2009).

50 Por lo tanto, la solicitud de patente internacional WO 2011/012707 describe un método *in vitro* para la producción de una población de células beta pancreáticas, que comprende la etapa de proporcionar Pax4 o un ácido nucleico que codifica Pax4 a al menos una célula alfa pancreática o al menos una célula precursora. La solicitud de patente US 2010/166675 describe un método *in vivo* de terapia para prevenir y tratar la diabetes. En la revisión de Courtney et al 2011, los autores se centran en los sucesos principales subyacentes en el desarrollo pancreático y la generación de células similares a  $\beta$  con métodos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, debido a (1) la interacción inhibitoria mutua que se da entre Pax4 y Arx y (2) la expresión de Arx en las células productoras glucagón, queda por determinar si la expresión ectópica de Pax4 en las células que expresan glucagón y la consiguiente conversión de células  $\alpha$  en células similares a  $\beta$  estuvieron provocadas directamente por Pax4 o por la inhibición posterior de la expresión de Arx. Además, se debería recordar que hasta ahora solamente se ha demostrado que Arx y Pax4 se inhiben mutuamente durante la embriogénesis, y en particular durante la génesis del páncreas, y nunca en las células beta pancreáticas adultas (Kordowich et al., 2011).

La capacidad regenerativa de las células alfa pancreáticas (o células productoras de glucagón), y su capacidad de conversión en células similares a  $\beta$  mediante la simple expresión ectópica de Pax4, tienen interés en el contexto de la investigación de T1D. Sin embargo, esta aproximación transgénica sería inviable para el desarrollo de terapias selectivas en seres humanos.

5 Así, la posibilidad de producir células  $\beta$  a partir de células  $\alpha$  inhibiendo directamente Arx en dichas células (p.ej. en células  $\beta$  adultas) no se ha demostrado de manera experimental y ni siquiera se ha propuesto, mientras existe la necesidad de disponer de un método sencillo y seguro que genere células  $\beta$  que se puedan usar en el campo terapéutico (*in vivo*), así como en el campo del cribado (*in vitro*). Además, es muy necesaria la identificación de compuestos pequeños que imiten los efectos de la inhibición de Arx y/o que induzcan la conversión de células alfa pancreáticas en células beta pancreáticas.

10 A lo largo de las pasadas décadas, numerosos estudios han descubierto un papel para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en el páncreas endocrino y en la diabetes mellitus. GABA, sintetizado a partir de glutamato mediante una ácido glutámico descarboxilasa (GAD) en las células  $\beta$ , es una molécula de señalización extracelular en los islotes pancreáticos. Una vez liberado, se cree que GABA sirve como regulador funcional de la secreción de hormonas pancreáticas o como molécula de señalización paracrina de acción rápida para la comunicación entre las células  $\beta$  y las otras células endocrinas de los islotes de Langerhans. La presencia de receptores GABA<sub>B</sub> en las células  $\beta$  y de receptores GABA<sub>A</sub> en las células  $\alpha$  apoya el supuesto papel autocrino/paracrino del GABA secretado localmente en los islotes. De hecho, se demostró que la regulación por GABA de la secreción de hormonas está mediada por sus receptores. De manera interesante, se descubrió que GAD (la enzima implicada en la síntesis de GABA) es uno de los autoantígenos principales en T1D, y se descubrió que GABA está disminuido en el tejido pancreático endocrino en la diabetes experimental y humana. Estos hallazgos indican claramente que la red de GABA se altera en T1D, pero sigue sin aclararse su papel en esta patología. Además, varios estudios han demostrado que GABA participa en el mantenimiento de la masa de células  $\beta$  (Mendu et al., 2011; Soltani et al., 2011), induciendo la proliferación de las células  $\beta$  y protegiendo las células  $\beta$  de la apoptosis *in vitro* (Soltani et al., 2011; Ligon et al., 2007). De manera interesante, se demostró que GABA pudo disminuir los niveles de glucosa en sangre y ejercer efectos protectores y regenerativos sobre la masa de células  $\beta$  en la diabetes inducida por estreptozotocina en ratones (Soltani et al., 2011; Gómez et al., 2007). También se descubrió que GABA invierte la diabetes en ratones NOD (Soltani et al., 2011; Tian et al., 2011). La explicación propuesta fue que GABA podría actuar de una manera autocrina/paracrina para regenerar los islotes pancreáticos por medio de la proliferación de las células  $\beta$ .

### 30 **Resumen de la invención:**

La presente invención describe un método *ex vivo* para la producción de una población de células beta pancreáticas, que comprende las etapas de: i) proporcionar una población de células alfa pancreáticas; ii) inhibir la expresión o actividad de Arx en dicha población de células alfa pancreáticas; en el que la expresión de Arx se inhibe mediante el uso de un oligonucleótido de siARN, una ribozima, un oligonucleótido inverso, ácido gamma-amino butírico (GABA) o un agonista de receptores de GABA.

La presente invención también describe un inhibidor de la expresión génica de Arx y un agente inmunosupresor para el uso en un método que mejora la supervivencia de células beta pancreáticas regeneradas en un paciente que padece diabetes, en el que el inhibidor de la expresión génica de Arx es GABA o un agonista de receptores de GABA. En particular, la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

### 40 **Descripción detallada de la invención:**

Los inventores han demostrado que las células  $\beta$  inmaduras y adultas se pueden convertir *in vivo* en células funcionales que expresan insulina tras la inactivación individual de Arx en estas mismas células mediante el uso de dos líneas de ratón que permiten la inactivación condicional de la expresión de Arx en las células que expresan glucagón, la primera mediante el uso de una aproximación Cre-LoxP clásica, mientras la segunda permite la inactivación inducible y selectiva de Arx. Además, se inicia un ciclo de regeneración de células endocrinas acompañado por la neogénesis de islotes, por medio de un proceso que implica la reactivación del gen pro-endocrino Ngn3. De manera interesante, se observaron células recién formadas que expresaban insulina, que se originaron a partir de células previamente que expresaban glucagón, tras la inactivación de las células  $\beta$  inducida químicamente, lo que proporcionó una nueva oportunidad para el campo terapéutico.

50 En la presente memoria, al combinar las aproximaciones de la pérdida de la función condicional y del seguimiento del linaje, los inventores demuestran que la inhibición selectiva de Arx en las células  $\alpha$ , el antagonista de Pax4, es suficiente para estimular la conversión de las células  $\alpha$  adultas en células similares a  $\beta$  a cualquier edad. De manera interesante, esta conversión induce procesos compensatorios que dan como resultado una neogénesis continua de células  $\alpha$ , y tales células se convierten posteriormente en células similares a  $\beta$  tras la inhibición de Arx. De manera interesante, por medio de la generación y el análisis de mutantes dobles condicionales de Arx y Pax4, proporcionan pruebas de que Pax4 es prescindible para estos procesos de regeneración, lo que indica que Arx representa el desencadenante principal de la neogénesis de células similares a  $\beta$  mediada por células  $\alpha$ . De manera importante, la pérdida de Arx en las células  $\alpha$  es suficiente para regenerar la masa completa de células  $\beta$  tras la diabetes inducida por toxinas. Estos nuevos resultados destacan que solamente es necesaria la inhibición de la expresión de Arx para

la conversión de células  $\alpha$  en células similares a  $\beta$ .

Además, los inventores han demostrado que GABA tiene un efecto sobre la inhibición de la expresión de Arx en las células  $\alpha$ , que conduce a su conversión en células  $\beta$ . Para abordar esta cuestión, se trató a ratones de tipo natural (WT) y, para fines de seguimiento del linaje, ratones Glu-Cre::Rosa26-lox- $\beta$ -gal con GABA. Proporcionan pruebas de que las células que expresan glucagón se pueden convertir, tras la adición de GABA, en células productoras de insulina funcionales, lo que conduce a la hipertrofia de los islotes debida a una hiperplasia de células  $\beta$ . Se activa posteriormente un ciclo de regeneración de células endocrinas acompañado por la neogénesis de islotes, y tal proceso implica la reactivación del gen pro-endocrino Ngn3. Por último, tras el tratamiento con estreptozotocina y tras la adición de GABA, se regeneran células similares a  $\beta$ , y estas derivan de células que expresaban la hormona glucagón.

Los inventores han demostrado así que la administración a largo plazo de un inhibidor de la expresión o la actividad de Arx (tal como un oligonucleótido inverso o un siARN hacia Arx, GABA o un agonista de receptores de GABA) induce ciclos sucesivos de regeneración de células endocrinas estimulando la proliferación de las células dentro del epitelio/tapiz ductal, y tales células reexpresan el factor pro-endocrino Ngn3 y se convierten sucesivamente en células  $\alpha$  y células similares a  $\beta$ . Además, la administración a largo plazo de tal inhibidor de la expresión o la actividad de Arx se puede combinar con una administración simultánea o posterior de un agente inmunosupresor usado actualmente en la diabetes para proteger a las células funcionales productoras de insulina recién generadas *in vivo*. Por lo tanto, los inventores han desarrollado un método para inducir la conversión de células alfa pancreáticas en células beta pancreáticas en un paciente que lo necesita, en un número suficiente para producir suficiente insulina en dicho paciente, pero también para mejorar la supervivencia de dichas células  $\beta$  pancreáticas nuevas y por lo tanto para mantener el número de estas células beta para obtener un beneficio a largo plazo para el paciente.

#### Definiciones:

A lo largo de la memoria descriptiva se emplean varios términos, y se definen en los párrafos siguientes.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "células beta pancreáticas", "células beta" o "células beta que secretan insulina" se usan de manera intercambiable, y se refieren a células capaces de producir insulina tras la estimulación con glucosa. Más preferiblemente, se usa la expresión de antígenos superficiales específicos para determinar si una célula es una célula beta pancreática. Por ejemplo, las células beta pancreáticas expresan el transportador de glucosa, Glut2. De manera alternativa, se usa la expresión de factores de transcripción específicos para determinar si una célula es una célula beta pancreática. Por ejemplo, las células beta pancreáticas expresan a un nivel elevado los factores de transcripción Pdx1, Nkx6.1, MafA y Pax4. Por último, se puede usar la observación mediante microscopía electrónica para confirmar una ultraestructura típica de células beta.

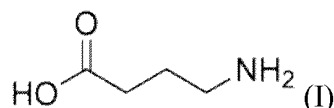
Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "células alfa pancreáticas", "células alfa" o "células que expresan glucagón" se usan de manera intercambiable, y se refieren a células capaces de expresar glucagón como consecuencia de niveles disminuidos de carbohidratos en sangre. Más preferiblemente, se usa la expresión de factores de transcripción específicos para determinar si una célula es una célula alfa pancreática. Por ejemplo, las células alfa pancreáticas expresan los factores de transcripción Arx, Brn-4 y MafA. Por último, se puede usar la observación mediante microscopía electrónica para confirmar una ultraestructura típica de células alfa.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "Arx" se refiere a la proteína de homeodominio relacionado con Aristaless, que es muy conocida en la técnica. El gen Arx es parte de una familia mayor de genes homeobox, que actúan durante el desarrollo embrionario temprano para controlar la formación de muchas estructuras corporales. La proteína Arx está implicada, por tanto, en el desarrollo del páncreas. El gen Arx humano que se da de manera natural tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en el número de acceso de Genbank NM\_139058.2, y la proteína Arx humana que se da de manera natural tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en el número de acceso de Genbank NP\_620689.1. También se han descrito las secuencias murinas de nucleótidos y aminoácidos (números de acceso de Genbank NM\_007492.3 y NP\_031518.2).

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "aislado" o "purificado", cuando se refieren a una célula o población de células, significan que dicha célula o dicha población de células están presentes con una ausencia sustancial de otras células o poblaciones de células. Los términos "aislado" o "purificado", tal como se usan en la presente memoria, significan que hay presentes preferiblemente al menos un 75% en peso o número, más preferiblemente al menos un 85% en peso o número, aún más preferiblemente al menos un 95% en peso o número, y lo más preferiblemente al menos un 98% en peso o número, de células del mismo tipo.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "agonista de receptor" se refiere al ligando nativo de ese receptor (p.ej., un receptor de GABA), a análogos del mismo u otros ligandos que "activan" de forma similar el receptor, y/o a un modulador alostérico positivo del receptor.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "GABA" se refiere al ácido gamma-amino butírico de fórmula (I) o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, así como las mezclas del mismo:



- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "agonista específico del receptor GABA<sub>A</sub>" se refiere a un agente que tiene actividad agonista en el receptor GABA<sub>A</sub>, y sustancialmente sin actividad agonista en el receptor GABA<sub>B</sub>. Un "agonista preferente del receptor GABA<sub>A</sub>" se refiere a un agente que tiene una mayor actividad agonista en el receptor GABA<sub>A</sub> que en el receptor GABA<sub>B</sub>. En general, el agonista preferente del receptor GABA<sub>A</sub> tiene una actividad al menos 1,2 veces, más preferiblemente al menos 1,5 veces, aún más preferiblemente al menos 2 veces, y lo más preferiblemente al menos 3 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces mayor en el receptor GABA<sub>A</sub> que en el receptor GABA<sub>B</sub>, y tal como se determina mediante el uso de un ensayo convencional de la actividad agonista en un receptor de GABA.
- 10 Tal como se usa en la presente memoria, el término "agonista específico del receptor GABA<sub>B</sub>" se refiere a un agente que tiene actividad agonista en el receptor GABA<sub>B</sub>, y sustancialmente sin actividad agonista en el receptor GABA<sub>A</sub>. Un "agonista preferente del receptor GABA<sub>B</sub>" se refiere a un agente que tiene una mayor actividad agonista en el receptor GABA<sub>B</sub> que en el receptor GABA<sub>A</sub>. La invención describe que el agonista preferente del receptor GABA<sub>B</sub> tiene una actividad al menos 1,2 veces, más preferiblemente al menos 1,5 veces, aún más preferiblemente al menos 2 veces, y lo más preferiblemente al menos 3 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces mayor en el receptor GABA<sub>B</sub> que en el receptor GABA<sub>A</sub>, tal como se determina mediante el uso de un ensayo convencional de la actividad agonista en un receptor de GABA.

#### *Métodos para la producción de una población de células beta pancreáticas*

- 20 Los inventores han demostrado que es posible producir células beta pancreáticas inactivando la expresión de Arx en las células alfa pancreáticas.

La presente descripción proporciona, por tanto, un método *ex vivo* para la producción de una población de células beta pancreáticas, que comprende la etapa de inhibir la expresión o la actividad de Arx en una población de células alfa pancreáticas.

- 25 Preferiblemente, la descripción proporciona un método *ex vivo* para la producción de una población de células beta pancreáticas, que comprende las etapas de: i) proporcionar una población de células alfa pancreáticas; ii) inhibir la expresión o la actividad de Arx en una población de células alfa pancreáticas, en el que la expresión de Arx se inhibe mediante el uso de un oligonucleótido de siARN, una ribozima, un oligonucleótido inverso, ácido gamma-amino butírico (GABA) o un agonista de receptores de GABA.

- 30 Se conocen en la técnica métodos para proporcionar al menos una población de células alfa, e incluyen aislar tejido pancreático y aislar las células, p.ej. con la ayuda de FACS (clasificador de células) tal como se conoce en la técnica para proporcionar una línea de células alfa (Powers, 1990). Preferiblemente, la población de células alfa pancreáticas está en una forma purificada.

La invención describe que las células alfa pancreáticas son células alfa pancreáticas de adulto.

- 35 Los métodos para determinar si una célula tiene un fenotipo de célula beta pancreática se conocen en la técnica, e incluyen incubar la célula con glucosa y ensayar si se incrementa o se induce la expresión de insulina en la célula (Nolan, 2009). Otros métodos incluyen ensayar si se expresan factores de transcripción específicos de células beta, la detección de productos de genes específicos de células beta con la ayuda de PCR cuantitativa de ARN, el trasplante de una célula candidata a ratones diabéticos, y el ensayo posterior de la respuesta fisiológica tras dicho trasplante, así como el análisis de las células mediante microscopía electrónica.

- 40 La invención describe que el método comprende las siguientes etapas, que consisten en aislar una población de células alfa pancreáticas; inhibir la expresión o actividad de Arx en dicha población de células alfa pancreáticas; cultivar dicha población de células, en las que se ha inhibido la expresión o actividad de Arx en condiciones que permiten la conversión de las células  $\alpha$  en células  $\beta$ . En general, dicha población de células alfa pancreáticas se cultiva en un medio líquido adecuado para el cultivo *in vitro* o *ex vivo* de células de mamífero, en particular de células humanas. Un medio de cultivo de la invención se puede basar en un medio disponible comercialmente, tal como RPMI1640 de Invitrogen.

*La inhibición de la expresión o la actividad de Arx se puede conseguir mediante cualquier técnica.*

La invención describe que la expresión de Arx se puede inhibir mediante el uso de un oligonucleótido de siARN, oligonucleótido inverso o ribozima.

- 50 Los oligonucleótidos inversos, que incluyen las moléculas de ARN inverso y las moléculas de ADN inverso, actuarían para bloquear directamente la traducción del mRNA de Arx uniéndose a él, y así impedirían la traducción a proteínas o incrementarían la degradación del mRNA, por lo que disminuiría el nivel de proteínas Arx, y por tanto la actividad,

en una célula. Por ejemplo, se pueden sintetizar oligonucleótidos inversos de al menos alrededor de 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia del transcrito de mRNA que codifica Arx, p.ej., mediante técnicas convencionales de formación de enlaces fosfodiéster. Los métodos para usar técnicas de moléculas inversas para inhibir de manera específica la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce son muy conocidos en la técnica (p.ej. véanse las pat. de EE.UU. n°s 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732).

Los ejemplos de dichos oligonucleótidos inversos hacia Arx incluyen, pero sin limitación, los adquiridos de Qiagen.

Los ARNs inhibitorios pequeños (siARNs) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de cArx para el uso en la presente invención. La expresión génica de Arx se puede reducir poniendo en contacto células alfa pancreáticas con un ARN bicatenario pequeño (dsRNA), o un vector o construcción que provoca la producción de un ARN bicatenario pequeño, de forma que se inhibe de manera específica la expresión de Arx (es decir, ARN de interferencia o ARNi). Los métodos para seleccionar un dsARN adecuado o un vector que codifica dsARN son muy conocidos en la técnica para genes cuya secuencia se conoce (p.ej., véase Tuschl, T. *et al.* (1999); Elbashir, S. M. *et al.* (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus, M.T. *et al.* (2002); Brummelkamp, T.R. *et al.* (2002); pat. de EE.UU. n°s 6.573.099 y 6.506.559; y publicaciones de patentes internacionales n°s WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836). Los ejemplos de dichos siARNs hacia Arx incluyen, pero sin limitación, los adquiridos de Qiagen (FlexiTube GeneSolution GS170302).

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de Arx para el uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica del ARN. El mecanismo de acción de las ribozimas implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima al ARN complementario objetivo, seguido de escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozimas modificadas con motivos de horquilla o de cabeza de martillo que catalizan de manera específica y eficaz la escisión endonucleolítica de las secuencias de mRNA de Arx son, por tanto, útiles dentro del alcance de la presente invención. Los sitios de escisión para ribozimas específicas dentro de cualquier objetivo de ARN potencial se identifican inicialmente mediante el barrido de la molécula objetivo en busca de sitios de escisión para ribozimas, que incluyen en general las siguientes secuencias, GUA, GUU, y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de ARN de entre alrededor de 15 y 20 ribonucleótidos que corresponden a la región del gen objetivo que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar con respecto a características estructurales predichas, tales como la estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia de oligonucleótidos sea inadecuada. La idoneidad de los objetivos candidatos también se puede evaluar ensayando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, mediante el uso, p.ej., de ensayos de protección de ribonucleasas.

Se pueden preparar oligonucleótidos inversos, oligonucleótidos de siARN y ribozimas útiles como inhibidores de la expresión de Arx mediante métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química tales como, p.ej., síntesis química mediante fosforamidita en fase sólida. De manera alternativa, se pueden generar moléculas de ARN inverso mediante transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia diversidad de vectores que incorporan promotores adecuados de ARN polimerasa tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones en los oligonucleótidos de la invención como medio para incrementar la estabilidad intracelular y la semivida. Las modificaciones posibles incluyen, pero sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos en los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en vez de enlaces fosfodiéster en el esqueleto del oligonucleótido. Se pueden administrar oligonucleótidos inversos, oligonucleótidos de siARN y ribozimas de la invención solos o junto con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido inverso, oligonucleótido de siARN o ácido nucleico de ribozima a las células alfa pancreáticas. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con una degradación reducida respecto del grado de degradación que ocurriría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagómidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación del oligonucleótido inverso, oligonucleótido de siARN o secuencias de ácido nucleico de ribozimas.

Los métodos para administrar siARNs, ribozimas y/o oligonucleótidos inversos a células alfa pancreáticas son muy conocidos en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, la transfección, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección con un vector viral que contiene las secuencias génicas, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosos métodos en la técnica para la introducción de genes exógenos en células, y se pueden usar de acuerdo con la presente invención, con tal de que no se alteren las funciones fisiológicas y del desarrollo necesarias de las células receptoras. La técnica puede proporcionar la transferencia estable del gen a la célula, de forma que el gen es expresable por parte de la célula, heredable y expresable por parte de la progenie de la célula. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se colocan después bajo selección para aislar las células que han captado y están expresando el gen transferido. Esas células se administran después a un sujeto. Una variación de la técnica puede proporcionar la transferencia transitoria de oligonucleótidos o genes que codifican oligonucleótidos a células alfa pancreáticas para posibilitar la expansión temporal de las células alfa pancreáticas *ex vivo* o *in vivo* sin una modificación genética

permanente.

La invención describe que la expresión de Arx se puede inhibir mediante ácido gamma-amino butírico (GABA), y/o un análogo de GABA, y/o un agonista (o agonista parcial) de receptores de GABA, y/o un potenciador de GABA, y/o un profármaco de GABA.

- 5 La invención describe que el agonista de receptores de GABA actúa sobre los dos receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. La invención describe que el agonista de receptores de GABA actúa preferentemente, o exclusivamente, sobre el receptor GABA<sub>A</sub> o GABA<sub>B</sub>.

Los agonistas de receptores de GABA son muy conocidos para los expertos en la técnica.

- 10 Los agonistas de receptores de GABA ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ciertos barbituratos (p.ej., tiopental, tiamilal, pentobarbital, secobarbital, hexobarbital, butobarbital, amobarbital, barbital, mefobarbital, fenobarbital, primidona, y similares), ciertas benzodiazepinas (p.ej., midazolam, triazolam, lometazepam, flutazolam, nitrazepam, flurirazepam, nimetazepam, diazepam, medazepam, oxazolam, prazepam, tofiosopam, rilmazafona, lorazepam, temazepam, oxazepam, fluidazepam, clordiazepóxido, cloxazolam, flutoprazepam, alprazolam, estazolam, bromazepam, flurazepam, clorazepato potásico, haloxazolam, loflazepato de etilo, cuazepam, clonazepam, mexazolam, y similares), ciertas tienodiazepinas (p.ej., etizolam, brotizolam, clotiazepam, y similares), ciertos dialquilfenoles (p.ej., propofol, fospropofol, y similares), ciertos análogos de benzodiazepinas (p.ej., Zolpidem, zopiclona, exzopiclona, etc.), y similares.
- 15

- 20 La invención describe que el agonista de receptores de GABA se selecciona del grupo que consiste en muscimol, THIP/gaboxadol, isoguvacina, amina koji, homotaurina, homohipotaurina, ácido trans-aminociclopentano-3-carboxílico, ácido trans-amino-4-crotónico, ácido β-guanidinopropiónico, homo-P-prolina, ácido isonipecótico, ácido 3-((aminoiminometil)tio)-2-propenoico (ZAPA), ácido imidazolacético, y ácido piperidin-4-sulfónico (P4S).

De manera alternativa, se puede usar una glutamato descarboxilasa o ácido glutámico descarboxilasa (GAD), que son enzimas que catalizan la descarboxilación de glutamato a GABA y CO<sub>2</sub>.

La invención describe que se usan las enzimas que sintetizan GABA GAD65 o GAD67.

- 25 Se conocen bien en la técnica los métodos para poner en contacto una población de células, en particular una población de células alfa pancreáticas, con un polipéptido de interés, tal como un polipéptido GAD65 o un polipéptido GAD67, o un vector que codifica el gen de GAD65 o GAD67.

La invención describe que se puede inhibir la expresión de Arx mediante compuestos que actúan sobre la actividad del promotor, el procesamiento del ARN o la estabilidad de la proteína.

- 30 La invención describe que se puede conseguir la inhibición de la actividad de Arx mediante el uso de polipéptidos de Arx mutados que compiten con el Arx de tipo natural.

- 35 Esta técnica se denomina en general técnica de "mutantes negativos dominantes". Un mutante negativo dominante es un polipéptido o una secuencia de la región codificante de ácido nucleico que se ha cambiado con respecto a al menos una posición en la secuencia, respecto de la versión nativa de tipo natural correspondiente en una posición que cambia una posición de residuo de aminoácido en un sitio activo necesario para la actividad biológica del péptido nativo. Por ejemplo, un mutante negativo dominante puede consistir en una molécula de Arx truncada desprovista de los dominios efectores N-terminales que puede actuar como inhibidor competitivo de Arx por la unión al ADN y la transactivación. La eficacia de la represión de Arx se puede mejorar adicionalmente mediante la fusión a dominios represores que incrementan la función inhibitoria.

- 40 Los métodos de la invención se llevan a cabo exponiendo células alfa pancreáticas a un mutante negativo dominante *in vitro* o *ex vivo*. La exposición se puede realizar transfectando la célula con un polinucleótido que codifica el polipéptido mutante negativo dominante, y expresando dicho mutante negativo dominante codificado por el polinucleótido, de forma que se inhibe la actividad de Arx. Los métodos para transfectar tales polinucleótidos pueden consistir en los descritos anteriormente.

- 45 La exposición también se puede realizar exponiendo directamente las células alfa pancreáticas a un polipéptido mutante negativo dominante, por ejemplo poniendo en contacto la célula con dicho polipéptido, preferiblemente acoplado a un resto de interiorización.

- 50 Se conocen en la técnica restos de interiorización adecuados, y, por ejemplo, se pueden seleccionar del grupo que consiste en una secuencia de interiorización de péptidos derivada de proteínas tales como el polipéptido TAT de VIH o Antennapedia, u otras homeoproteínas. De manera alternativa, la transferencia puede estar mediada por un liposoma, y un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o ligando que se une a un receptor superficial de la célula objetivo.

Como alternativa, los inhibidores de la actividad pueden consistir en moléculas que son inhibidores de la modificación postraduccional enzimática que regulan una actividad tal como la fosforilación, acetilación, metilación,

ribosilación, ubiquitinación, modificación con moléculas pequeñas similares a ubiquitina (SUMOilación, neddyilación, etc.), o moléculas que alteran la conformación o interacción con coactivadores o correpresores. Como alternativa adicional, los inhibidores de la actividad pueden consistir en inhibidores de la unión del ADN, la dimerización o la interacción con cofactores.

- 5 Los inhibidores de la actividad pueden incluir macromoléculas o moléculas orgánicas pequeñas. La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas usadas en general en los productos farmacéuticos. La expresión excluye las macromoléculas biológicas (p.ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.). El tamaño de las moléculas orgánicas pequeñas preferidas oscila hasta alrededor de 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da, y lo más preferiblemente hasta alrededor de 1000 Da.
- 10 La invención describe que el método comprende además una etapa de poner en contacto la población de células alfa pancreáticas con un polipéptido Pax4, un ácido nucleico que codifica un gen Pax4 o un vector que comprende el mismo. Dicha etapa se puede llevar a cabo de manera simultánea o secuencial (es decir, antes o después de) la etapa de inhibir la expresión o la actividad de Arx en una población de células alfa pancreáticas, tal como un oligonucleótido inverso o un siARN hacia Arx, GABA o un agonista de receptores de GABA.
- 15 Los métodos para poner en contacto una población de células, en particular una población de células alfa pancreáticas, con un polipéptido Pax-4, un ácido nucleico que codifica un gen Pax-4 o un vector que comprende el mismo se describen en la solicitud de patente internacional WO 2011/012707 y en Collombat *et al.* 2009.

#### *Células deficientes de Arx*

- 20 Los métodos de la invención conducen a la generación de células beta pancreáticas de gran interés en el campo terapéutico, así como en el campo del cribado.

Por lo tanto, la presente invención describe así una población de células beta pancreáticas obtenibles mediante el método descrito anteriormente. Preferiblemente, la población de células beta pancreáticas está en una forma purificada.

- 25 La invención describe una población de células alfa pancreáticas, que no expresan Arx o en las que la expresión o actividad de Arx está suprimida o inhibida. Preferiblemente, las células alfa pancreáticas carecen del gen Arx. Las células alfa pancreáticas pueden ser de cualquier especie. Preferiblemente son de origen murino o de origen humano.

La invención describe que las células alfa pancreáticas son células alfa pancreáticas de adulto.

- 30 Según la presente invención, las células beta pancreáticas se pueden generar fácilmente y de manera eficaz *in vitro* o *ex vivo*. La capacidad de obtener un gran número de células beta pancreáticas *in vitro* o *ex vivo* da lugar a nuevas oportunidades para el campo terapéutico.

La presente invención proporciona así una composición farmacéutica que comprende células beta pancreáticas como se definió anteriormente, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

#### *Métodos terapéuticos y usos*

- 35 La presente invención proporciona métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para la prevención o el tratamiento de la diabetes.

La presente invención describe un inhibidor de la expresión génica de Arx para el uso en la prevención o el tratamiento de la diabetes de un paciente que lo necesita.

- 40 Preferiblemente, la invención se refiere a un inhibidor de la expresión génica de Arx para el uso en la prevención o el tratamiento de la diabetes de un paciente que lo necesita, con la condición de que dicho inhibidor de la expresión génica de Arx no sea un polipéptido Pax-4 o un ácido nucleico que codifica el gen Pax-4, o un vector que comprende el mismo.

- 45 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "inhibidor de la expresión génica" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico que inhibe o reduce significativamente la expresión de un gen. Por lo tanto, un "inhibidor de la expresión génica de Arx" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico que inhibe o reduce significativamente la expresión del gen que codifica la proteína Arx.

- 50 Tal como se usa en la presente memoria, "diabetes" se refiere a la clase amplia de trastornos caracterizados por una producción alterada de insulina y una tolerancia alterada a la glucosa. La diabetes incluye la diabetes tipo 1 y tipo 2, diabetes gestacional, prediabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, y tolerancia alterada a la glucosa. La diabetes tipo I también se conoce como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID). Las expresiones se usan de manera intercambiable en la presente memoria. La diabetes tipo 2 también se conoce como diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID).



Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "un paciente que lo necesita" se refiere a un sujeto al que se le ha diagnosticado diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, prediabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, o tolerancia alterada a la glucosa, o uno que corre riesgo de desarrollar cualquiera de estos trastornos. Los pacientes que necesitan tratamiento también incluyen aquellos que han padecido una lesión, enfermedad, o procedimiento quirúrgico que afecta al páncreas, o los individuos que de otra manera tienen una alteración de su capacidad de producir insulina. Tales pacientes pueden ser cualquier mamífero, p.ej., ser humano, perro, gato, caballo, cerdo, oveja, ganado bovino, ratón, rata o conejo (preferiblemente un ser humano).

La expresión "prevención de un trastorno", tal como se usa en la presente memoria, no pretende significar una expresión absoluta. En su lugar, la prevención, p.ej., de la diabetes tipo 2, se refiere al retraso del inicio, la frecuencia reducida de los síntomas, o la gravedad reducida de los síntomas asociados al trastorno. La prevención, por lo tanto, se refiere a una amplia diversidad de medidas profilácticas que entenderán los expertos en la técnica. En ciertas circunstancias, se reduce la frecuencia y gravedad de los síntomas a niveles no patológicos, p.ej., de forma que el individuo no necesita una terapia de sustitución de insulina tradicional. En ciertas circunstancias, los síntomas de un paciente que recibe un inhibidor de la expresión génica de Arx según la invención tienen solamente un 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 o 1% de la frecuencia o gravedad de los síntomas experimentados por un individuo con el trastorno sin tratar.

De forma similar, la expresión "tratamiento de un trastorno" no pretende ser una expresión absoluta. En ciertas circunstancias, los inhibidores de la expresión génica de Arx según la invención pretenden reducir la pérdida de células productoras de insulina que conduce a los síntomas diabéticos. En ciertas circunstancias, el tratamiento con los inhibidores de la expresión génica de Arx conduce a un pronóstico mejorado o a una reducción de la frecuencia o gravedad de los síntomas.

La invención describe que el inhibidor de la expresión génica de Arx es un oligonucleótido de siARN, una ribozima, o un oligonucleótido inverso como se describió previamente.

La invención también describe un método para la prevención o el tratamiento (p.ej. tratamiento profiláctico) de la diabetes, que comprende administrar a un paciente que lo necesita un inhibidor de la expresión génica de Arx.

Los inhibidores de la expresión génica de Arx se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica, como se define más adelante. Preferiblemente, dicho inhibidor se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente del inhibidor de la expresión génica de Arx para prevenir o tratar la diabetes con una proporción razonable beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico.

Se entenderá que el uso diario total de los compuestos de la presente invención lo decidirá el médico que aplica el tratamiento de acuerdo con el buen juicio médico. El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de la administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o de manera coincidente con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, la experiencia en la técnica permite comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado, e incrementar gradualmente la dosis hasta alcanzar el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos se puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al paciente a tratar. Un medicamento contiene en general de alrededor de 0,01 mg a alrededor de 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a alrededor de 100 mg del ingrediente activo. Se suministra una cantidad eficaz del fármaco generalmente a un nivel de dosis de 0,0002 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de alrededor de 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.

Preferiblemente, la presente invención describe un inhibidor de la expresión génica de Arx para el uso en un método para inducir la conversión de células alfa pancreáticas en células beta pancreáticas en un paciente que lo necesita, con la condición de que dicho inhibidor de la expresión génica de Arx no sea un polipéptido Pax-4 o un ácido nucleico que codifica el gen Pax-4, o un vector que comprende el mismo.

La presente invención también describe un método para inducir la conversión de células alfa pancreáticas en células beta pancreáticas en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la expresión génica de Arx.

La invención describe que el inhibidor de la expresión génica de Arx no es un polipéptido Pax-4 o un ácido nucleico que codifica el gen Pax-4, o un vector que comprende el mismo.

El término "conversión" se usa de manera intercambiable en la presente memoria con la frase "transdiferenciación", y se refiere a la conversión de un tipo de célula somática diferenciada en un tipo de célula somática diferenciada diferente sin someter a reprogramación completa a un intermedio de célula madre pluripotente inducida (iPSC).

Preferiblemente, la estimulación de la conversión de una célula somática, p.ej., células alfa pancreáticas en células beta pancreáticas tal como se describe en la presente memoria, dará como resultado más de alrededor del 5% o alrededor del 10% de conversión de una célula somática, p.ej., células alfa pancreáticas en células beta pancreáticas. Aún más preferiblemente, se convertirá más de alrededor del 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o 90% de una célula somática, p.ej., células alfa pancreáticas, en células beta pancreáticas.

La invención describe que el inhibidor de la expresión génica de Arx es ácido gamma-amino butírico (GABA), y/o un análogo de GABA, y/o un agonista (o agonista parcial) de receptores de GABA, y/o un potenciador de GABA, y/o un profármaco de GABA.

La invención describe que el agonista de receptores de GABA actúa en los dos receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. La invención describe que el agonista de receptores de GABA actúa preferentemente, o exclusivamente, en el receptor GABA<sub>A</sub> o GABA<sub>B</sub>.

Los agonistas de receptores de GABA son muy conocidos para los expertos en la técnica.

Los agonistas de receptores de GABA ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ciertos barbituratos (p.ej., tiopental, tiamilal, pentobarbital, secobarbital, hexobarbital, butobarbital, amobarbital, barbital, mefobarbital, fenobarbital, primidona, y similares), ciertas benzodiazepinas (p.ej., midazolam, triazolam, lometazepam, flutazolam, nitrazepam, fluritrazepam, nimetazepam, diazepam, medazepam, oxazolam, prazepam, tofisopam, rilmazafona, lorazepam, temazepam, oxazepam, fluidazepam, clordiazepóxido, cloxazolam, flutoprazepam, alprazolam, estazolam, bromazepam, flurazepam, clorazepato potásico, haloxazolam, loflazepato de etilo, cuazepam, clonazepam, mexazolam, y similares), ciertas tienodiazepinas (p.ej., etizolam, brotizolam, clotiazepam, y similares), ciertos dialquilfenoles (p.ej., propofol, fospropofol, y similares), ciertos análogos de benzodiazepinas (p.ej., Zolpidem, zopiclona, exzopiclona, etc.), y similares.

La invención describe que el agonista de receptores de GABA se selecciona del grupo que consiste en muscimol, THIP/gaboxadol, isoguvacina, amina koji, homotaurina, homohipotaurina, ácido trans-aminociclopentano-3-carboxílico, ácido trans-amino-4-crotónico, ácido β-guanidinopropiónico, homo-P-prolina, ácido isonipecótico, ácido 3-((aminoiminometil)tio)-2-propenoico (ZAPA), ácido imidazolacético, y ácido piperidin-4-sulfónico (P4S).

La invención describe que el inhibidor de la expresión génica de Arx (tal como un siARN hacia Arx, GABA o un agonista de receptores de GABA) se administra a largo plazo.

De hecho, como se describe más adelante en los Ejemplos, se han tratado ratones con GABA durante 2 o 3 meses para revelar un incremento del número de células que expresan insulina y del número de islotes. Se observa que los seres humanos en general se tratan durante más tiempo que los ratones u otros animales experimentales ejemplificados en la presente memoria, cuyo tratamiento tiene una duración proporcional a la duración del proceso de la enfermedad y a la eficacia del fármaco. Las dosis pueden ser dosis individuales o dosis múltiples a lo largo de un periodo de varios días, preferiblemente durante un periodo de varias semanas, o más preferiblemente durante un periodo de varios meses. A modo de ejemplo, pero no de limitación, el inhibidor de la expresión génica de Arx se puede administrar a un paciente que lo necesita a intervalos regulares, por ejemplo, pero sin limitación, semanalmente o mensualmente, etc., mediante cualquier medio adecuado conocido para las personas de experiencia habitual en la técnica durante varias semanas o varios meses.

Además, el inhibidor de la expresión génica de Arx se puede administrar de manera intermitente a un paciente que lo necesita de manera intermitente. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "administración intermitente" se refiere a un periodo de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la expresión génica de Arx, seguido de un periodo de tiempo de suspensión, que después va seguido de otro periodo de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz, y así sucesivamente. A modo de ejemplo pero no de limitación, el inhibidor de la expresión génica de Arx se puede administrar a un paciente que lo necesita a intervalos regulares, por ejemplo, pero sin limitación, semanalmente o mensualmente, etc., mediante cualquier medio adecuado conocido para las personas de experiencia habitual en la técnica durante varias semanas o varios meses, después se detiene durante varias semanas o varios meses, y se administra de nuevo al paciente semanalmente o mensualmente durante varias semanas o varios meses.

#### *Composiciones farmacéuticas*

El inhibidor de la expresión génica de Arx se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas unitarias de administración adecuadas comprenden formas para la vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublinguales y bucales, aerosoles, implantes, formas de

administración subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales e intranasales, y formas de administración rectales.

5 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular isotónicas, estériles, soluciones salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro sódico, potásico, cálcico o magnésico, y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

10 Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilen glicol acuoso; y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida, de manera que se pueda utilizar fácilmente con una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe preservar de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

15 Las disoluciones que comprenden los compuestos de la invención en forma de base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilen glicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

20 El inhibidor de la expresión génica de Arx de la invención se puede formular en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden obtener a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido sódico, potásico, amónico, cálcico, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

30 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede llevar a cabo mediante diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tимерosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo usando en las composiciones agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los polipéptidos activos en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con otros de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización mediante filtración. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución de los mismos previamente esterilizada mediante filtración.

45 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación farmacéutica, y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

50 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debería tamponar de manera adecuada si es necesario, y el diluyente líquido primero se haría isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos para los expertos en la técnica teniendo en cuenta la presente descripción. Por ejemplo, se podría disolver una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirla a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarla en el sitio propuesto de infusión. Se dará necesariamente cierta variación en la dosis dependiendo de la afección del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual.

55 El inhibidor de la expresión génica de Arx de la invención se puede formular en una mezcla terapéutica para que comprenda alrededor de 0,0001 a 1,0 miligramos, o alrededor de 0,001 a 0,1 miligramos, o alrededor de 0,1 a 1,0 o incluso alrededor de 10 miligramos por dosis más o menos. También se pueden administrar múltiples dosis.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p.ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones de liposomas; cápsulas de liberación retardada; y cualquier otra forma usada actualmente.

- 5 La invención también describe una composición farmacéutica para el uso en un método para inducir la conversión de células alfa pancreáticas en células beta pancreáticas en un paciente que lo necesita, que comprende GABA o un agonista de receptores de GABA como se describió anteriormente.

*Terapias de combinación de la invención:*

- 10 El inhibidor de la expresión génica de Arx de la invención se puede administrar a un paciente con un agente terapéutico adicional adecuado, tal como un agente inmunosupresor útil para mejorar la supervivencia de las células beta pancreáticas recién generadas.

La invención describe una composición farmacéutica o una composición para un kit de componentes que comprende un inhibidor de la expresión génica de Arx y un agente inmunosupresor.

- 15 La invención también describe un método para mejorar la supervivencia de células beta pancreáticas regeneradas en un paciente que lo necesita, que comprende una etapa de administrar a dicho paciente que padece diabetes una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la expresión génica de Arx y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunosupresor, en el que el inhibidor de la expresión génica de Arx es GABA o un agonista de receptores de GABA.

- 20 Los agentes inmunosupresores son fármacos que inhiben o previenen la actividad del sistema inmunitario, y son muy conocidos para el experto en la técnica.

La invención describe que los agentes inmunosupresores incluyen, pero sin limitación, uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en azatioprina, ácido micofenólico, leflunomida, teriflunomida, metotrexato, FKBP/ciclofilina, tacrólimus, ciclosporina, pimecrólimus, abétimus, guspérimus, sirólimus, deforólimus y everólimus.

- 25 La expresión "terapia de combinación" o "en combinación con", tal como se usa en la presente memoria, significa que se administran dos o más sustancias, por ejemplo GABA y Ciclosporina o GABA y Sirólimus, a un sujeto a lo largo de un periodo de tiempo, a la vez o de manera secuencial, p.ej. las sustancias se administran al mismo tiempo o en momentos diferentes dentro del periodo de tiempo de un régimen que proporcionará los efectos beneficiosos de la combinación de fármacos, a intervalos similares o diferentes. Por ejemplo, la terapia de combinación pretende abarcar la co-administración, de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una forma farmacéutica individual, p.ej. una cápsula, que tiene una proporción fija de ingredientes activos, o en múltiples formas farmacéuticas diferentes, p.ej. cápsulas, para cada sustancia. Los compuestos pueden ser o no ser biológicamente activos en el sujeto al mismo tiempo. Como ejemplo, se administra una primera sustancia semanalmente, y se administra una segunda sustancia diariamente. Los detalles exactos de la administración dependerán de la farmacocinética de las dos sustancias. Los diseños de los regímenes de dosificación adecuados son rutinarios para un experto en la técnica.
- 30
- 35

Por lo tanto, la invención también describe una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la expresión génica de Arx y un agente inmunosupresor para el uso en la mejora de la supervivencia de células beta pancreáticas regeneradas en un paciente que lo necesita.

- 40 La invención describe que el inhibidor de la expresión génica de Arx es GABA o un agonista de receptores de GABA como se definió anteriormente.

La invención también describe una composición de kit de componentes que comprende un inhibidor de la expresión génica de Arx y un agente inmunosupresor para el uso en la mejora de la supervivencia de células beta pancreáticas regeneradas en un paciente que lo necesita.

- 45 Las expresiones "kit", "producto" o "preparación combinada", tal como se usan en la presente memoria, definen especialmente un "kit de componentes" en el sentido de que los compuestos de la combinación, como se definieron anteriormente, se pueden administrar independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades diferenciadas de los compuestos de la combinación, es decir, de manera simultánea o en momentos diferentes. Los componentes del kit de componentes se pueden administrar después, p.ej., de manera simultánea o espaciada cronológicamente, es decir, en momentos diferentes y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier componente del kit de componentes. Se puede variar la proporción de las cantidades totales de los compuestos de combinación a administrar en la preparación combinada. Los compuestos de combinación se pueden administrar mediante la misma vía o mediante vías diferentes. Cuando la administración es secuencial, el primer compuesto se puede administrar, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 o 24 h antes del segundo compuesto.
- 50

*Métodos de cribado*

Como se mencionó previamente, los métodos de la invención conducen a la generación de células beta pancreáticas de gran interés en el campo del cribado.

5 Por lo tanto, la presente invención describe un método para el cribado de un compuesto que induce un fenotipo de células beta pancreáticas, que comprende las etapas de a) poner en contacto al menos una célula con un compuesto determinado, y b) ensayar si dicho compuesto es capaz de inhibir la expresión génica de Arx.

La invención describe que dicha célula es una célula alfa pancreática.

De manera alternativa, se pueden usar otras células adultas, especialmente células hepáticas, células ductales o células intestinales como material de partida del método de la presente invención.

10 Como alternativa adicional, se puede usar cualquier célula precursora capaz de diferenciarse en células beta pancreáticas como la célula de partida del método de la invención. La invención describe que dicha célula precursora se selecciona del grupo que consiste en una célula precursora pancreática, una célula precursora de intestino delgado, una célula precursora hepática, una célula precursora derivada de la población ductal, y una célula madre pancreática.

15 La invención describe que dicho ensayo incluye determinar si tras poner en contacto la célula también es capaz de producir insulina, en particular tras la incubación de las células con glucosa. Este resultado del cribado de la invención es especialmente adecuado, porque la capacidad de producir insulina es la característica principal de las células beta pancreáticas.

Esto da como resultado que dicho ensayo incluya tanto la capacidad de producir insulina como de determinar la expresión de Arx.

20 Así, la invención describe que el método para el cribado de un compuesto útil para inducir el fenotipo de célula beta pancreática comprende las etapas de: (a) seleccionar un compuesto de ensayo que inhibe la expresión de Arx llevando a cabo un método como se describió anteriormente, (b) determinar si dicho compuesto induce la producción de insulina en una célula, y (c) seleccionar positivamente el compuesto de ensayo capaz de inducir la producción de insulina en una célula.

25 *Métodos para determinar el nivel de expresión de un gen:*

La determinación del nivel de expresión de un gen se puede llevar a cabo mediante una diversidad de métodos muy conocidos en la técnica.

30 En general, el nivel de expresión tal como se determina es un nivel de expresión relativo. Por ejemplo, la determinación comprende poner en contacto la muestra biológica (p.ej. una muestra de células puesta en contacto con un compuesto de ensayo) con reactivos selectivos tales como sondas, cebadores o ligandos, y de ese modo detectar la presencia, o medir la cantidad, de polipéptido o ácidos nucleicos de interés en un principio en dicha muestra biológica. La puesta en contacto se puede llevar a cabo en cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, placa de microtitulación, tubo de ensayo, pocillo, vidrio, columna, etc. La invención describe que la puesta en contacto se lleva a cabo sobre un sustrato revestido con el reactivo, tal como una matriz de ácido nucleico o una matriz de ligando específico. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido tal como cualquier soporte adecuado que comprende vidrio, plástico, nailon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede ser de diversas formas y tamaños, tal como un portaobjetos, una membrana, una microesfera, una columna, un gel, etc. La puesta en contacto se puede hacer en cualquier condición adecuada para que se forme un complejo detectable, tal como un híbrido de ácido nucleico o un complejo anticuerpo-antígeno, entre el reactivo y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra biológica.

40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "determinar" incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (es decir, detectar y/o medir el nivel de expresión) con o sin referencia a un control o un valor predeterminado. Tal como se usa en la presente memoria, "detectar" significa determinar si Arx está presente o no en una muestra biológica, y "medir" significa determinar la cantidad de Arx en una muestra biológica. En general, se puede determinar el nivel de expresión, por ejemplo, mediante RT-PCR o inmunohistoquímica (IHC) llevadas a cabo con una muestra biológica.

La invención describe que se puede determinar el nivel de expresión determinando la cantidad de mRNA.

50 Los métodos para determinar la cantidad de mRNA son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras biológicas (p.ej., células o tejidos preparados del paciente) se extrae primero según métodos habituales, por ejemplo mediante el uso de enzimas líticas o disoluciones químicas, o se extrae mediante resinas de unión de ácidos nucleicos siguiendo las instrucciones del fabricante. El mRNA extraído se detecta después mediante hibridación (p.ej., análisis de transferencia de Northern) y/o amplificación (p.ej., RT-PCR). Se prefiere la RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa. La RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real es especialmente ventajosa.

Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por la transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA).

5 Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que exhiben complementariedad u homología de secuencias hacia el mRNA de interés en la presente memoria tienen utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que no es necesario que tales ácidos nucleicos sean idénticos, pero en general son al menos alrededor del 80% idénticos a la región homóloga de un tamaño comparable, más preferiblemente un 85% idénticos, y aún más preferiblemente un 90-95% idénticos.

10 Otros métodos para determinar el nivel de expresión de dichos genes incluyen la determinación de la cantidad de proteínas codificadas por el gen *Arx*.

Tales métodos comprenden poner en contacto la muestra con una molécula de unión capaz de interactuar selectivamente con una proteína marcadora presente en la muestra. La molécula de unión es en general un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal. Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia *Arx* son muy conocidos para el experto en la técnica, tales como los anticuerpos comercializados por Abcam (anticuerpo anti-*Arx* ab48856).

*Compuestos de ensayo de la invención:*

20 La invención describe que el compuesto de ensayo se puede seleccionar del grupo que consiste en péptidos, proteínas, moléculas peptidomiméticas, moléculas orgánicas pequeñas, aptámeros o ácidos nucleicos. Por ejemplo, el compuesto de ensayo según la invención se puede seleccionar de una biblioteca de compuestos previamente sintetizados, o una biblioteca de compuestos para los que la estructura se determina en una base de datos, o de una biblioteca de compuestos que se han sintetizado *de novo*. La invención describe que el compuesto de ensayo se puede seleccionar de moléculas orgánicas pequeñas como se definió anteriormente.

La invención describe que el compuesto de ensayo es un compuesto conocido, como un análogo de GABA, un agonista (o agonista parcial) de receptores de GABA, un potenciador de GABA o un profármaco de GABA.

25 La invención se ilustrará adicionalmente mediante las figuras y ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deberían interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

**Figuras:**

30 Figura 1: Cuantificación de células endocrinas en páncreas Glu-*Arx*KO e IndGlu-*Arx*KO. Comparación cuantitativa del número de células que expresan insulina (A), glucagón (B) y somatostatina (C) entre ratones de 6 meses de edad Glu-*Arx*KO, 4mDox+ IndGlu-*Arx*KO y WT de igual edad. Se observó un incremento significativo del número de células que expresaban insulina y somatostatina en ambas líneas transgénicas en comparación con los controles, mientras se observaron variaciones del número de células que expresaban glucagón. n=3, \*\* p<0,01 mediante el uso de ANOVA.

35 Figura 2: Las células insulina<sup>+</sup> generadas tras la inactivación de *Arx* son funcionales. Se expuso a glucosa a animales Glu-*Arx*KO de 2,5 meses de edad (y controles de igual edad/sexo) (A). Los animales mutantes mostraron una capacidad incrementada de contrarrestar la inyección rápida de glucosa, con un máximo inferior de glucemia, y una vuelta más rápida a la euglucemia, lo que sugiere una masa de células β incrementada, indicada además por los niveles aumentados de insulina circulante en los animales Glu-*Arx*KO en comparación con sus homólogos WT (Tabla insertada en A). También hubo resultados similares evidentes en los animales 1.2mDox+ IndGlu-*Arx*KO (B y Tabla insertada), en los que se observó una reducción más rápida de los niveles de glucosa y una vuelta más rápida a la euglucemia en comparación con los controles WT y Dox (B). La exposición de ambas líneas transgénicas con insulina no dio como resultado una diferencia significativa en comparación con sus homólogos de control (C-D), lo que indica que la insulina permanece completamente activa a pesar de la hiperplasia de las células similares a β. Los animales IndGlu-*Arx*KO se sometieron posteriormente a tratamiento con estreptozotocina tras 1,5 meses (E), o solamente 0-10 días (F) tras el inicio del tratamiento con Dox. En ambos casos, mediante la monitorización de los niveles glucémicos, tras un máximo inicial de glucemia, se observó una recuperación estable en los animales inducidos, mientras los controles mantuvieron su estado hiperglucémico o sucumbieron por los excesivos niveles glucémicos. n>6 para todos los experimentos, \*\*\* p<0,001, \* p<0,05 mediante el uso de ANOVA.

50 Figura 3: Análisis cuantitativos tras la inactivación doble de *Arx* y *Pax4* en células productoras de glucagón. (A-E) Comparación cuantitativa del número de células que expresaban insulina (A), glucagón (B) y somatostatina (C) entre animales de 5 meses de edad Glu-*Arx*KO/*Pax4*KO y controles WT de igual edad/sexo. Se observó un incremento significativo del número de células que expresaban insulina y somatostatina en los animales Glu-*Arx*KO/*Pax4*KO, mientras no se observó una variación significativa en las células glucagón<sup>+</sup>. De manera interesante, tanto el recuento de islotes (D) como el tamaño (E) se incrementaron significativamente en estos animales en comparación con sus homólogos WT, lo que sugiere un proceso de neogénesis de islotes, además de una masa incrementada de células insulina<sup>+</sup>. (F) se expusieron a glucosa animales de 3 meses de edad Glu-*Arx*KO/*Pax4*KO (y controles WT de igual edad/sexo). Los animales mutantes dobles mostraron una capacidad incrementada de contrarrestar la inyección

rápida de glucosa, con un máximo inferior de glucemia, lo que sugiere una masa incrementada de células  $\beta$  funcionales.  $n \geq 3$  en todos los experimentos, \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  mediante el uso de ANOVA.

Figura 4: La masa de células similares a  $\beta$  se puede regenerar tras el tratamiento con estreptozotocina en ratones tratados con GABA, y las células insulina<sup>+</sup> neo-generadas son funcionales. Los ratones WT se sometieron a tratamiento con estreptozotocina (STZ), y 15 a 20 días después se trataron con GABA o agua. Tras un máximo de glucemia, se observa una recuperación estable para los animales tratados con GABA, mientras los controles mueren de hiperglucemia extrema (A). Tal recuperación está asociada a una regeneración clara de su masa de células  $\beta$  monitorizada 5, 10, 25 y 45 días tras la administración de estreptozotocina mediante inmunoquímica. 85 días tras la inyección de estreptozotocina, los animales WT tratados con GABA y STZ y los controles sin tratar se sometieron a un ensayo de tolerancia a la glucosa (GTT) (B). Los ratones tratados con GABA se comportaron mejor que los controles, con un máximo inferior de glucemia y una vuelta más rápida a la euglucemia, lo que sugiere una masa incrementada de células  $\beta$ .

Figura 5: Expresión relativa de mRNA de Arx en células  $\alpha$ -TC1-6 tratadas con GABA: Se trataron células  $\alpha$ -TC1-6 con concentraciones crecientes de GABA durante diferentes periodos de tiempo. Se midió la expresión relativa de mRNA de Arx en las diferentes condiciones. Se observó una disminución de la expresión de Arx en las células tratadas con GABA en comparación con las células no tratadas. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ;  $n \geq 3$ ; datos analizados estadísticamente mediante un ANOVA unidireccional, todos los datos representados como la media  $\pm$  EEM.

## EJEMPLO 1: INHIBICIÓN GENÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE ARX

### 20 Materiales y Métodos

*Manipulaciones de ratones:* Para estudiar la invalidación del gen *Arx* de manera específica en las células  $\alpha$  pancreáticas, se usaron dos líneas transgénicas. En primer lugar, se usó una aproximación Cre-LoxP clásica (*ArxcKO::GluCre*) cruzando la *ArxcKO* descrita previamente (Fulp et al., 2008), generada mediante recombinación homóloga insertando dos sitios loxP alrededor del segundo exón del gen *Arx*, y la línea de ratón glucagón-cre clásica, descrita por Herrera et al. (2000). Los experimentos de seguimiento del linaje se realizaron mediante el cruce de animales *ArxcKO* con una línea de ratones *GluCre\_ROSA26- $\beta$ -Gal* (Soriano, 1999). En segundo lugar, se generó un sistema inducible aprovechando el sistema TetOn (Clontech), por lo que se obtuvieron ratones transgénicos dobles cruzando ratones *Glu-rtTA* y *TetOCre* (Belteki et al., 2005), se cruzaron adicionalmente con ratones *ArxcKO* y la línea de ratón *GluCre-ROSA26- $\beta$ -Gal* para fines de seguimiento del linaje. En la línea de ratón transgénico triple resultante (*ArxcKO::Glu-rtTA-TetOCre*), se inactiva condicionalmente *Arx* de manera específica en las células que expresan glucagón, y solamente tras tratamiento con doxiciclina. Se administró doxiciclina (Sigma) por medio del agua de bebida recién preparada una vez a la semana a una concentración de 2 g/L. Para estudiar la proliferación celular tras la inducción mediada por doxiciclina de *Arx*, se trataron ratones *ArxcKO::Glu-rtTA-TetOCre* con doxiciclina y posteriormente con BrdU durante 10 días antes del examen. Se detectaron las células que habían incorporado BrdU durante la replicación del ADN mediante inmunohistoquímica (Invitrogen).

Para analizar la inactivación de *Pax4* en mutantes de *Arx*, se cruzaron ratones con inactivación condicional de *Pax4*, previamente descritos por Kordowich et al. 2012, con animales *Glu-Cre::ArxcKO* (*Glu-Cre::ArxcKO::Pax4cKO*).

*Inmunohistoquímica:* Los tejidos se fijaron en un 4% de PFA durante 30 min a 4 °C, se incrustaron en parafina y se aplicaron cortes de 8  $\mu$ m a los portaobjetos. Estos cortes se ensayaron como se describió previamente (Collombat et al., 2003). Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: anti-insulina policlonal de conejillo de Indias (1/500-Linco), anti-glucagón (1/500-Linco), anti-insulina monoclonal de ratón (1/500-Sigma), anti-glucagón (1/500-Sigma), anti-somatostatina de rata (1/250-Millipore), anti-PP de conejo (1/100), anti-Glut2 (1/5000), anti-PC1/3 (1/500), anti-Nkx6.1 (1/3000), anti-Pdx1 (1/1000), anti-NeuroDI (1/200), anti-pax4 (1/4000), anti-*Arx* (1/500-), anti-BrdU de ratón (1/40). Los anticuerpos secundarios (1/1000-Molecular Probes) usados fueron: 594-alexa anti-ratón; 488-alexa anti-ratón; 594-alexa anti-conejo; 488-alexa anti-conejo; 594-alexa anti-conejillo de Indias; 488-alexa anti-conejillo de Indias; 488-alexa anti-rata. Las fotografías se procesaron mediante el uso de ZEISS Axioimager Z1 y LEICA DM 6000 B. Para fines de cuantificación, se contaron manualmente las células teñidas en cada décimo corte.

*Experimentos de seguimiento del linaje basados en  $\beta$ -galactosidasa:* Los tejidos pancreáticos se aislaron y se fijaron durante 30 min a 4 °C en una disolución que contenía un 1% de formaldehído, 0,2% de glutaraldehído, 0,02% de NP40. Los tejidos se deshidrataron en un 25% de sacarosa durante la noche a 4 °C. Antes de cortarlos, los tejidos se incrustaron en un medio de congelación. Para la determinación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, los tejidos se lavaron en PBS y después se incubaron durante la noche en una disolución de tinción ( $K_3Fe(CN)_6$  500 mM,  $K_4Fe(CN)_6$  250 mM,  $MgCl_2$  0,5 M, 40 mg/ml de X-gal en DMF).

*Exposición y medida de los niveles de glucosa en sangre:* Para fines de exposición, los animales se sometieron a ayuno durante 16 h y se les inyectó de manera intraperitoneal glucosa (2 g/kg de peso corporal) o insulina (0,75 U/kg). Se midieron los niveles de glucosa en sangre en los momentos indicados tras la inyección con un glucómetro ONETOUCH Vita (Life Scan, Inc., CA).

*Microscopía electrónica:* Para los análisis ultraestructurales, los ratones anestesiados se perfundieron de manera transcardiaca con suero fisiológico, después con un 2 % de glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1 M. Los páncreas se disecaron, se sumergieron en fijador durante horas, se post-fijaron durante 2 h en 1% de tetraóxido de osmio en tampón cacodilato 0,1 M, y se incrustaron en resina epoxi. Se analizaron cortes ultrafinos contrastados (70 nm) en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 equipado con una cámara Morada Olympus CCD.

Para la tinción con inmuno-oro, 200 islotes, aislados mediante digestión con colagenasa (1 mg/ml), se fijaron con un 4% de paraformaldehído, 0,2% de glutaraldehído en tampón fosfato 0,1 M (PB) (pH 7,4) durante la noche a 4 °C, y se procesaron para ultracriomicrotomía según un método de Tokuyasu ligeramente modificado (Tokuyasu KT 1973). Las inmunotinciones se procesaron con un sistema de marcaje con inmuno-oro automatizado Leica EM IGL mediante el uso de anticuerpo primario anti-insulina de conejillo de Indias (1/500) y 15 nm de proteína AG conjugada a oro coloidal (CMC, Centro Médico Universitario, Utrecht, Países Bajos). Los cortes se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400.

*Tomografía de proyección óptica, cuantificación volumétrica y análisis de la imagen:* El análisis de OPT se llevó a cabo como se describió previamente (Sand et al., 2012). Cada muestra se escaneó mediante el uso del escáner de OPT Bioptics 3001 con una resolución de 1024×1024 píxeles, y se reconstruyó con el programa informático NRecon versión 1.6.1.0 (Skyscan).

La cuantificación de la masa de células productoras de insulina se realizó mediante el uso del programa informático Imaris (Biplane). Los volúmenes se calcularon aplicando una tarea de "hallar objetivos por la intensidad" para seleccionar los vóxeles por encima de una intensidad especificada. Se determinó manualmente el valor umbral de intensidad para cada pila de imágenes. Todos los páncreas se escanearon y se analizaron con enmascaramiento.

*Inducción de la diabetes mediada por estreptozotocina:* Para inducir la hiperglucemia, se disolvió STZ (Sigma) en tampón de citrato sódico 0,1 M (pH 4,5), y se administró una única dosis de manera intraperitoneal (100 mg/kg) en 10 min desde la disolución. La diabetes se evaluó monitorizando los niveles de glucosa en sangre y/o las tasas de supervivencia de los ratones.

*Análisis de datos:* Todos los valores se representan como la media  $\pm$  EEM, y se consideran significativos si  $P < 0,05$ . Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA.

*Análisis de ARN:* Se aisló el ARN (RNAeasy, Qiagen) y se llevó a cabo la síntesis de cADN (Superscript Choice System, Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa mediante el uso de cebadores validados (Qiagen) y el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR y la detección se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® ep realplex mediante el uso de GAPDH y HPRT1 como controles internos para fines de normalización.

## Resultados

La inactivación de *Arx* a cualquier edad da como resultado la hiperplasia de células productoras de insulina: Para determinar las consecuencias de la pérdida de *Arx* en las células  $\alpha$ , primero se generaron animales que permitían la delección constitutiva de *Arx* en todas las células productoras de glucagón cruzando la línea de ratón *Arx*CKO (en la que el segundo exón del gen *Arx* está flanqueado por sitios LoxP como se describió [Fulp et al., 2008]) con animales transgénicos Glu-Cre (generados mediante el uso de un transgén compuesto del promotor de glucagón que controla la expresión de la Cre recombinasa de fago P1). Los animales transgénicos dobles resultantes (denominados Glu-*Arx*CKO) se cruzaron adicionalmente con animales ROSA26-LoxP-Resistencia a Neomicina-STOP-LoxP- $\beta$ -gal (que contenían un transgén que abarcaba el promotor ROSA26 ubicado delante de una fusión del gen de resistencia a neomicina con codones STOP flanqueados por sitios LoxP y seguidos del cADN de  $\beta$ -galactosidasa [Soriano, 1999] - en adelante denominado Rosa) para fines de seguimiento del linaje.

Se llevaron a cabo varios ensayos para determinar la eficacia de esta aproximación. Primero, combinando varias aproximaciones inmunohistoquímicas, se analizaron animales Glu-Cre::Rosa homocigotos de 2 semanas de edad para verificar adicionalmente la eficacia de la actividad de Cre mediada por glucagón. Los resultados demostraron aproximadamente un 72 $\pm$ 7% de células glucagón<sup>+</sup>  $\beta$ -gal<sup>+</sup> en el páncreas de estos animales, un resultado de acuerdo con los datos publicados previamente [Collombat et al., 2009, Herrera, 2000, Quoix et al., 2007]. A continuación, se ensayaron páncreas Glu-*Arx*CKO de igual edad con respecto a la expresión de *Arx*: los análisis cuantitativos indicaron una pérdida de la expresión de *Arx* en aproximadamente un 70 $\pm$ 6% de células productoras de glucagón en comparación con los controles *Arx*CKO o de tipo natural, una proporción que coincide con el contenido de células Cre<sup>+</sup>. Es digno de mención que, en varias de estas células *Arx*<sup>-</sup> Glucagón<sup>+</sup>, se detectó claramente *Pax4*, lo que sugiere que la pérdida de *Arx* puede inducir la expresión ectópica de *Pax4* en las células  $\alpha$ . Por último, se usó qPCR para cuantificar el contenido de transcritos de *Arx*: una comparación de los controles frente a los páncreas Glu-*Arx*CKO proporcionó una reducción del 74% en los transcritos de *Arx* tras la deficiencia de *Arx*, un resultado de acuerdo con la cuantificación de células. En conjunto, los resultados sugieren que, en este modelo experimental, Cre puede conducir de manera eficaz a la inactivación de *Arx* en las células productoras de glucagón.

En un segundo grupo de experimentos, para desarrollar un modelo animal que permita la delección inducible de *Arx* en las células  $\alpha$  adultas, se cruzó la línea de ratón *Arx*CKO con la línea transgénica Glu-rTA (que contiene un



transgén compuesto del promotor de *glucagón* de rata [Herrera et al., 1994] en posición anterior del *transactivador inverso dependiente de tetraciclina*, y se apareó adicionalmente con animales TetOCre (cuyo transgén incluye el operador *Tet* en posición anterior al cADN de *Cre Recombinasa* [Perl et al., 2009]). Los ratones transgénicos triples resultantes se denominarán en adelante IndGlu-ArxKO (Glu inducible-ArxKO). Para valorar la especificidad de las secuencias reguladoras y cualquier supuesta filtración de expresión de transgenes, los ratones Glu-rTA se cruzaron inicialmente con la línea de ratones bien establecida TetO-β-gal [Henninghausen et al., 1995]. Se ensayaron los páncreas de ratones Glu-rTA::TetO-β-gal de 6 semanas de edad con respecto a la expresión de β-galactosidasa en células glucagón<sup>+</sup> tras 2 semanas de tratamiento con doxiciclina (Dox). En adelante, los ratones tratados con Doxiciclina durante x meses se denominarán xmDox+. En todos los casos, los animales sin tratar se hallaron similares fenotípicamente a sus homólogos de tipo natural (WT), y se denominarán "Dox-" o "controles". Se descubrió que la expresión de transgenes estuvo regulada de manera específica por Glu-rTA, ya que se detectó actividad de β-galactosidasa en aproximadamente del 80 al 90% de las células glucagón<sup>+</sup>, pero no en ningún otro subtipo de células del páncreas. El análisis combinado de células productoras de Arx, glucagón, y Pax4 proporcionó una pérdida de Arx en aproximadamente un 89±9% de las células marcadas para glucagón, pocas de las cuales iniciaron la expresión de Pax4, lo que indica que, en este modelo inducible, se puede inactivar de manera eficaz Arx en células productoras de glucagón.

Se descubrió que Glu-ArxKO y Dox+ IndGlu-ArxKO fueron viables y fértiles, y su esperanza de vida o glucemia basal permanecieron dentro del intervalo normal (Tabla S1-2). De manera interesante, se observó un incremento sustancial del tamaño de los islotes en ambos modelos animales (Tabla S1-2). Los análisis adicionales indicaron que la razón subyacente de la hipertrofia observada de los islotes fue la gran hiperplasia de las células insulina<sup>+</sup>. En los animales Glu-ArxKO, fue evidente una correlación entre la edad y el sobrecrecimiento de los islotes, aunque se observó una fase de meseta tras 4 meses de edad (Tabla S1). De forma similar, en Dox+ IndGlu-ArxKO, se descubrió que el grado de hiperplasia de los islotes dependió de la duración del tratamiento con Dox en vez de la edad de inducción con Dox (Tabla S2). Igual de importante fue el hallazgo de que, en ambos casos, fue evidente un incremento drástico del número de islotes, indicativo de la neogénesis de islotes (Tabla S1-2). El número incrementado de islotes y la hiperplasia de células insulina<sup>+</sup> se demostraron adicionalmente por medio de tomografía de proyección óptica, que permitió el examen de las células insulina<sup>+</sup> en todo el páncreas. De hecho, de ese modo se proporcionó un incremento pancreático global del 171±9% del número de células insulina<sup>+</sup> en páncreas Glu-ArxKO de 5 meses de edad en comparación con los controles de igual edad. En conjunto, los datos sugieren que la inactivación de Arx en las células α de cualquier edad da como resultado una hipertrofia clara de islotes, provocada por una hiperplasia de células insulina<sup>+</sup> y un incremento sustancial del número de islotes.

Tabla S1: Valoración de la esperanza de vida, los niveles glucémicos, el tamaño de los islotes, y el número de islotes en animales Glu-ArxKO. Se examinaron ratones Glu-ArxKO a las edades indicadas. Se descubrió que la esperanza de vida y la glucemia basal (monitorizadas semanalmente) estuvieron dentro de los intervalos normales, en comparación con los controles. Los animales Glu-ArxKO mostraron un incremento claro del tamaño de los islotes dependiente de la edad, sin embargo este incremento pareció alcanzar una meseta aproximadamente a los 4 meses de edad. También se observó un incremento del número de islotes, indicativo de la neogénesis de islotes, que alcanzó un máximo a una media de x1,98 en comparación con los controles.

Animales Glu-ArxKO				
Edad de examen	Esperanza de vida	Glucemia basal	Recuento de islotes frente a controles de igual edad/sexo	Tamaño de islotes frente a controles de igual edad/sexo
2,4 meses	Normal	167	x 1,4	x 1,8
4 meses	Normal	121	x 1,7	x 3,3
6,1 meses	Normal	172	x 2,6	x 3,4
7,2 meses	Normal	141	x 2,1	x 3,3
11,4 meses	Normal	140	x 2,1	x 3

Tabla S2: Valoración de la esperanza de vida, los niveles glucémicos, el tamaño de los islotes, y el número de islotes en animales IndGlu-ArxKO. Los ratones IndGlu-ArxKO se trataron con Dox a diferentes edades, y se examinaron después de las duraciones indicadas de tratamiento con Dox (valores clasificados basándose en la duración del tratamiento con Dox). Se descubrió que la esperanza de vida y la glucemia basal (monitorizadas semanalmente) estuvieron dentro de los intervalos normales, en comparación con los controles, en todas las condiciones analizadas. De manera interesante, se observó prácticamente una duplicación (1,8x) del tamaño de los islotes después de solamente 14 días de Dox, con un incremento estable del tamaño de los islotes dependiente de la duración del tratamiento con Dox hasta que pareció alcanzarse una meseta después de aproximadamente 4 meses de tratamiento con Dox. No se observaron grandes variaciones en el número de islotes entre las diferentes duraciones de tratamiento con Dox, sin embargo, de media, se observó un incremento de 1,9 veces en los animales Dox+

IndGlu-Arx en comparación con los controles de igual edad.

Animales Dox+ IndGlu-ArxKO					
Edad de Tratamiento con Dox	Duración de Tratamiento con Dox	Esperanza de vida	Glucemia basal	Recuento de islotes frente a controles de igual edad/sexo	Tamaño de islotes frente a controles de igual edad/sexo
2,2 meses	14 días	Normal	135	x 1,5	x 1,8
2,3 meses	1 mes	Normal	153	x 1,2	x 1,6
1,8 meses	2,6 meses	Normal	151	x 2,3	x 2,4
2 meses	3,8 meses	Normal	194	x 2,6	x 3,4
5,7 meses	4,1 meses	Normal	136	x 1,6	x 2,1
2,5 meses	4,8 meses	Normal	134	x 2,4	x 2,8
9 meses	5,5 meses	Normal	119	x 1,7	x 3,1
2 meses	5,8 meses	Normal	163	x 2,1	x 2,7
2,3 meses	10,3 meses	Normal	139	x 2,4	x 3,3

Las células insulina<sup>+</sup> en los mutantes de Arx muestran un fenotipo de células  $\beta$ : Para confirmar la identidad de las células insulina<sup>+</sup> en páncreas Glu-ArxKO y Dox+ IndGlu-ArxKO, se ensayó la expresión de varios genes marcadores de células endocrinas. Los análisis demostraron que todas las células insulina<sup>+</sup> observadas en los páncreas Glu-ArxKO y Dox+ IndGlu-ArxKO expresaron los marcadores fiables de células  $\beta$  Pax4, PC1/3, Glut-2, Pdx1, Nkx6.1, MafA, NeuroD1, HB9, y el marcador pan-endocrino Pax6. Se descubrió que carecieron de los determinantes de las células  $\alpha$ , tales como Brn-4 y glucagón, así como somatostatina o PP (véase a continuación, y datos no mostrados).

Debido a que estos resultados sugirieron que las células insulina<sup>+</sup> observadas en los páncreas Glu-ArxKO y Dox+ IndGlu-ArxKO mostraron un fenotipo de células  $\beta$ , se intentó confirmar estas observaciones mediante el uso de microscopía electrónica combinada con la detección de insulina mediante marcaje con inmuno-oro. Tras el examen de más de 200 cortes de páncreas por animal, pareció que, en ambos genotipos, todas las células productoras de insulina mostraron una ultraestructura de células  $\beta$ . De forma similar, se descubrió que todas las células que expresaron una ultraestructura de células  $\beta$  fueron positivas para insulina. Los análisis adicionales de las células endocrinas en Glu-ArxKO y Dox+ IndGlu-ArxKO proporcionaron una mayoría de células glucagón<sup>+</sup>, somatostatina<sup>+</sup> o PP<sup>+</sup> anormalmente localizadas en un polo del islote, cerca de los conductos adyacentes. De manera interesante, los experimentos cuantitativos indicaron un incremento del número de células que expresaban insulina o somatostatina (Figura 1A, C) y variaciones en el contenido de células productoras de glucagón (Figura 1B). En conjunto, los datos indican que la delección de Arx en las células  $\alpha$  a cualquier edad conduce a un incremento sustancial del contenido de células insulina<sup>+</sup>, y tales células muestran la mayoría de características de las verdaderas células  $\beta$ . Además, las células distintas de  $\beta$  muestran una localización anormal dentro del islote, cerca de los conductos.

Las células  $\alpha$  se convierten en células similares a  $\beta$  tras la inactivación de Arx: Para caracterizar adicionalmente los efectos de la inactivación de Arx en las células  $\alpha$ , se intentó seguir su linaje por medio del análisis de páncreas Glu-ArxKO::Rosa combinando la tinción con XGal y las aproximaciones inmunohistoquímicas. En páncreas de control Glu-Cre::Rosa, se hallaron células marcadas con  $\beta$ -gal únicamente en la zona del manto de los islotes, en la que residen en general las células glucagón<sup>+</sup>. De manera importante, en los páncreas Glu-ArxKO::Rosa, también se descubrió dicho marcaje en el núcleo de los islotes, en donde se detectan clásicamente las células insulina<sup>+</sup>. Por medio de inmunohistoquímica, se observó una expresión clara de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en numerosas células productoras de insulina, lo que demuestra una conversión de las células productoras de glucagón en células que expresan insulina. De manera interesante, un análisis similar llevado a cabo en animales IndGlu-ArxKO::Rosa de igual edad tratados con Dox durante un mes también proporcionó numerosas células insulina<sup>+</sup>  $\beta$ -gal<sup>+</sup>. Es digno de mención que la co-detección de  $\beta$ -gal con glucagón o somatostatina proporcionó como se esperaba células glucagón<sup>+</sup>  $\beta$ -gal<sup>+</sup>, mientras se descubrió que todas las células somatostatina<sup>+</sup> fueron negativas para  $\beta$ -gal, lo que sugiere que las células somatostatina<sup>+</sup> supernumerarias no derivan de células que han expresado la hormona glucagón. En conjunto, los resultados proporcionan pruebas concluyentes de que, tras la inactivación de Arx, las células  $\alpha$  de diferentes edades también se pueden convertir en células insulina<sup>+</sup>.

Aunque la conversión de las células  $\alpha$  en células similares a  $\beta$  tiene interés, no puede justificar la drástica hiperplasia de células similares a  $\beta$  observada en los modelos animales, ni la detección continua de células glucagón<sup>+</sup> a pesar de su conversión. Por lo tanto, para comprender mejor los mecanismos subyacentes en estos procesos, se ensayaron células en proliferación mediante el uso de la detección inmunohistoquímica del marcador Ki67. De manera importante, en los páncreas Glu-ArxKO, las células Ki67+ se hallaron sobre todo localizadas en el tapiz

ductal, cerca del agrupamiento de células distintas de  $\beta$ . Por lo tanto, se investigó si *Ngn3* se podría reexpresar en animales que carecieran de *Arx* en las células  $\alpha$ . De hecho, se descubrió previamente que *Ngn3* se reexpresaba en las células del tapiz ductal en animales que se sometieron a ligadura de los conductos pancreáticos [Xu et al., 2008] o con la expresión incorrecta forzada de *Pax4* en las células  $\alpha$  [Collombat et al., 2009]. El trabajo adicional sugirió que se podrían generar células *Ngn3*<sup>+</sup> continuamente y convertirlas en células endocrinas [Xu et al., 2008, Collombat et al., 2009]. Por lo tanto, se ensayaron los páncreas *Glu-Arx*KO con respecto a *Ngn3* mediante el uso de inmunohistoquímica. Se debería indicar que *Ngn3* se ha observado previamente en las células endocrinas [Wang et al., 2009], sin embargo, no se pudieron detectar células productoras de *Ngn3* en los controles, muy probablemente debido a un bajo nivel de expresión. Sin embargo, se observó una expresión clara de *Ngn3* únicamente en las células localizadas en el tapiz ductal pancreático de animales que carecían de *Arx* en las células  $\alpha$ . De manera importante, también se descubrió que el objetivo posterior de *Ngn3*, *Rfx6* [Soyer et al., 2009], se expresó de manera ectópica en el tapiz ductal de dichos animales. En conjunto, estos resultados proporcionan pruebas de que, tras la deficiencia de *Arx* mediada por células  $\alpha$ , las células  $\alpha$  se convierten en células similares a  $\beta$ . Esto a su vez induce procesos de regeneración continuos caracterizados por la proliferación de las células del tapiz ductal, la reexpresión de los factores del desarrollo *Ngn3* y *Rfx6*, y la neogénesis compensatoria de células glucagón<sup>+</sup>, y tales células adquieren una identidad de células similares a  $\beta$  tras la expresión de *glucagón* y la inactivación posterior de *Arx*.

La simple inactivación de *Arx* puede inducir la regeneración de una masa de células  $\beta$  funcionales tras la diabetes inducida químicamente: En un esfuerzo continuo por confirmar la identidad de las células insulina<sup>+</sup> suplementarias en los animales con inactivación específica de células  $\alpha$  de *Arx*, se llevaron a cabo numerosos ensayos. Es importante reiterar que tanto los animales *Glu-Arx*KO como *Dox*<sup>+</sup> *IndGlu-Arx*KO mostraron niveles normales de glucemia basal (Tablas S1-2). Sin embargo, tras la exposición a una dosis elevada de glucosa, se descubrió que mostraban una respuesta mejorada, con una elevación inferior de la glucemia y una vuelta más rápida a la euglucemia en comparación con los animales de control (Figura 2A-B). Esto sugiere una capacidad mejorada de liberar insulina tras la estimulación con glucosa. De hecho, cuando se combinaron dichas exposiciones a glucosa con las medidas de insulina, aunque se descubrió que los niveles basales de insulina estuvieron dentro del intervalo normal, se observó un incremento drástico del contenido de insulina circulante en comparación con los controles (Figura 2A-B, Tablas). Los resultados, por lo tanto, apoyan la noción de una masa incrementada de células similares a  $\beta$  capaces de responder a una inyección rápida de glucosa. De manera importante, tras la exposición a insulina y a pesar del número aumentado de células similares a  $\beta$ , se descubrió que las variaciones de los niveles glucémicos resultantes fueron similares en animales *Glu-Arx*KO, *Dox*<sup>+</sup> *IndGlu-Arx*KO, y de control (Figura 2C-D). Esto indica que, a pesar de una hiperplasia de las células similares a  $\beta$ , tales animales no desarrollan resistencia a insulina.

Para determinar si las células insulina<sup>+</sup> neo-formadas podrían sustituir funcionalmente a las células  $\beta$  endógenas, se inyectó a animales *IndGlu-Arx*KO una dosis elevada de estreptozotocina para anular la masa de células  $\beta$  endógenas. Se usaron dos grupos de animales *IndGlu-Arx*KO y controles correspondientes: el primero ("pretratamiento largo") correspondió a animales en los que el tratamiento con *Dox* se inició 1,5 meses antes, y el segundo ("pretratamiento corto") de 0 a 10 días, antes de la administración de estreptozotocina, y el tratamiento con *Dox* continuó para ambos grupos hasta su examen (Figura 2E-F, respectivamente). Todos los animales de control desarrollaron una hiperglucemia extrema, que condujo a la muerte de la mayoría de ellos (Figura 2E-F). De manera interesante, todos los animales *Dox*<sup>+</sup> *IndGlu-Arx*KO también desarrollaron una hiperglucemia intensa, pero ninguno murió (Figura 2E-F). Igual de importante fue la observación de que, tras esta fase hiperglucémica, se proporcionó una vuelta progresiva a los niveles normales (Figura 2E-F). Es interesante observar que también fue evidente una vuelta a la euglucemia cuando se desencadenó la inactivación de *Arx* mediada por *Dox* en las células  $\alpha$  el día de la inyección de estreptozotocina (Figura 2F), lo que sugiere mecanismos eficaces/rápidos que permiten el restablecimiento de un equilibrio glucémico adecuado.

Mediante análisis inmunohistoquímicos, se observó una pérdida clara de células  $\beta$  poco después del tratamiento con estreptozotocina. Sin embargo, se proporcionó una neogénesis clara en estos animales *Dox*<sup>+</sup> *IndGlu-Arx*KO, lo que dio como resultado la reposición de la masa de células  $\beta$ . De manera importante, cuando se llevaron a cabo los mismos experimentos en ratones *Dox*<sup>+</sup> *IndGlu-Arx*KO::Rosa, los experimentos de seguimiento del linaje confirmaron que la mayoría de células similares a  $\beta$  regeneradas pasaron a través de una fase de expresión de glucagón, lo que sugiere la neogénesis de células  $\alpha$  antes de la adquisición de una identidad de células similares a  $\beta$  tras la inactivación de *Arx*. En conjunto, estos resultados demuestran adicionalmente que la pérdida de un alelo funcional de *Arx* en células productoras de glucagón es suficiente para inducir su conversión en células similares a  $\beta$ . Los datos también sugieren que tras dicha conversión, se activan mecanismos compensatorios y conducen a la neogénesis de células  $\alpha$ , que de nuevo se convierten en células similares a  $\beta$  tras la expresión de *glucagón*, y de ese modo la inactivación de *Arx*. Este ciclo de regeneración de células similares a  $\beta$  es capaz de contrarrestar la diabetes inducida por toxinas, y dichas células son capaces de mantener la euglucemia.

La inactivación adicional de *Pax4* en los mutantes de *Arx* no afecta a la neogénesis de células similares a  $\beta$  mediada por células  $\alpha$ : Se demostró previamente que la expresión forzada de *Pax4* en las células glucagón<sup>+</sup> fue suficiente para inducir su neogénesis y conversión en células similares a  $\beta$  [Collombat et al., 2009]. En la presente memoria se demuestra que, de hecho, la inactivación de *Arx* iniciada en células  $\alpha$  embrionarias, pero también adultas, es suficiente para inducir un resultado similar. Por lo tanto, se puede concluir que la expresión anormal de *Pax4* en las células  $\alpha$  podría inducir la inhibición de *Arx*, y de ese modo desencadenar la neogénesis de células similares a  $\beta$  mediada por células  $\alpha$ . Sin embargo, también podría ser verdadero lo opuesto, es decir, que la delección de *Arx*

podría estimular tales procesos mediante la estimulación de *Pax4*. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se generaron animales mutantes dobles que permitieron la delección condicional de *Arx* y *Pax4* de manera específica en las células  $\alpha$ . Para conseguir este fin, se cruzaron animales *Arx*CKO con animales *Pax4*CKO (generados mediante introducción de dos sitios LoxP en el locus de *Pax4* [Kordowitch et al., 2012]). Los animales transgénicos dobles resultantes se cruzaron posteriormente con ratones Glu-Cre para generar animales Glu-cre::*Arx*CKO::*Pax4*CKO (denominados Glu-*Arx*CKO/*Pax4*CKO). Mediante el uso de inmunohistoquímica en páncreas transgénicos triples de 3 meses de edad, se descubrió que las células productoras de glucagón fueron negativas para *Arx* y *Pax4*. De manera importante, también se descubrió que varias células productoras de insulina carecieron de *Pax4*, y tales células correspondieron muy probablemente a células  $\alpha$  convertidas en células similares a  $\beta$  *Arx*<sup>Y/-</sup> *Pax4*<sup>-/-</sup>. El examen adicional de estos páncreas transgénicos triples mediante inmunohistoquímica proporcionó, de nuevo, un incremento sustancial del número de islotes y una hipertrofia clara de islotes provocada por una hiperplasia de las células insulina<sup>+</sup>, que se descubrió que fue similar a la observada en los animales con delección de *Arx*. Los análisis cuantitativos confirmaron este aumento del número de células insulina<sup>+</sup> (Figura 3A-E), pero también del contenido de células somatostatina<sup>+</sup>, y las células distintas de  $\beta$  se hallaron de nuevo localizadas preferentemente cerca de los conductos en los islotes. Fue digno de mención que la observación de que, a pesar de la carencia de *Pax4* en la mayoría de células  $\beta$ , no se pudo detectar una alteración de la glucemia basal de mutantes dobles de 6 meses de edad en comparación con los controles (127±7 mg/dl y 121±4 mg/dl, respectivamente). De manera interesante, tras la exposición a glucosa, los animales Glu-*Arx*CKO/*Pax4*CKO mostraron una respuesta significativamente mejorada como se observó previamente en los ratones Glu-*Arx*CKO (Figura 3F), lo que sugiere una masa incrementada de células similares a  $\beta$  funcionales. En conjunto, el análisis sugiere que la pérdida combinada de *Arx* y *Pax4* en las células productoras de glucagón da como resultado un fenotipo similar al de los mutantes de *Arx*, lo que sugiere que *Arx* representa la pieza principal implicada en los procesos de neogénesis de células similares a  $\beta$  mediados por células  $\alpha$ .

#### DISCUSIÓN:

En este estudio, se informa que la inactivación del gen *Arx* en las células  $\alpha$  pancreáticas a diferentes edades da como resultado islotes hipertróficos compuestos principalmente de células que expresan un fenotipo de células  $\beta$ . Los datos apoyan la noción de una conversión de células  $\alpha$  en células similares a  $\beta$  tras la simple inactivación de *Arx*. Estos procesos desencadenan mecanismos compensatorios, asociados a la reexpresión de *Ngn3* y *Rfx6*, que dan como resultado la neogénesis de células similares a  $\alpha$ , y tales células se convierten posteriormente en células similares a  $\beta$  tras la expresión de *glucagón*, y de ese modo la inactivación de *Arx*. De manera importante, las células similares a  $\beta$  recién formadas son funcionales y pueden invertir la diabetes inducida químicamente. Igual de interesante fue el hallazgo de que la pérdida adicional de *Pax4* no afecta a estos mecanismos, lo que sugiere que *Arx* representa el inductor principal de la neogénesis de las células similares a  $\beta$  mediada por células  $\alpha$ .

La inactivación de *Arx* induce que las células  $\alpha$  adquieran una identidad de células similares a  $\beta$ : Se analizaron dos modelos de ratones transgénicos que permitieron (1) la inactivación constitutiva de *Arx* en todas las células productoras de glucagón tan pronto como inicia la expresión de hormonas (es decir, durante la embriogénesis), o (2) la pérdida inducible de *Arx* en las células  $\alpha$  a cualquier edad. En ambos casos, se descubrió que la inactivación de *Arx* fue bastante eficaz, y un 70-90% de las células glucagón<sup>+</sup> parecieron deficientes de *Arx*. De manera interesante, se descubrió que varias células *Arx*<sup>Y/-</sup> glucagón<sup>+</sup> expresaron de manera ectópica el gen específico de células  $\beta$  *Pax4*. Debido a que se descubrió previamente que *Pax4* y *Arx* inhiben mutuamente la transcripción del otro durante el transcurso de la morfogénesis del páncreas [Collombat et al., 2005], es concebible que la pérdida de *Arx* pueda dar como resultado la reactivación de *Pax4* en las células  $\alpha$ . Esta noción estuvo apoyada por las alteraciones fenotípicas observadas en ambos modelos, reminiscentes de las halladas en animales con expresión ectópica constitutiva de *Pax4* en las células productoras de glucagón [Collombat et al., 2009]. De hecho, se observó una progresiva hiperplasia de células insulina<sup>+</sup>/hipertrofia de islotes y un incremento sustancial del número de islotes. Sin embargo, a diferencia de los animales que expresaron anormalmente *Pax4* en las células glucagón<sup>+</sup>, los ratones Glu-*Arx*CKO y Dox+ IndGlu-*Arx*CKO mostraron una esperanza de vida normal, una glucemia basal normal, y un incremento limitado de islotes totales/población de células insulina<sup>+</sup>. Estas discrepancias se pueden atribuir muy probablemente a diferencias en la eficacia de la expresión de los transgenes, pero también, en el caso de Dox+ IndGlu-*Arx*CKO, al hecho de que la deficiencia de *Arx* se desencadena en las células  $\alpha$  a edades más tardías.

Mediante el uso del seguimiento del linaje, se demuestra que la pérdida de *Arx* en las células  $\alpha$  induce su conversión en células que expresan la mayoría de características de las células  $\beta$  verdaderas, tal como se proporciona por medio del análisis de genes marcadores, el examen de microscopía electrónica, y los ensayos funcionales. Es interesante observar la similitud de las alteraciones fenotípicas en los animales Glu-*Arx*CKO e IndGlu-*Arx*CKO tratados con Dox a diferentes edades. De hecho, esto sugiere que el envejecimiento no es un factor limitante para este proceso de conversión, ni para la neogénesis resultante de células insulina<sup>+</sup>. En otras palabras, los datos indican que las células  $\alpha$  adultas que se han sometido a envejecimiento y señales ambientales conservan su capacidad de conversión en células similares a  $\beta$ .

Origen de las células similares a  $\beta$  neo-generadas: Aunque se demostró una conversión de células productoras de glucagón en células similares a  $\beta$ , también se observó sistemáticamente la presencia continuada de células  $\alpha$  en ambos modelos animales, y los análisis de cuantificación no mostraron variaciones significativas en su contenido en comparación con los controles. Esto sugiere que se activan procesos de neogénesis para compensar la pérdida de

las células  $\alpha$  convertidas. Es probable que la falta de glucagón provocada por esta conversión corresponda a la señal desencadenante de tal neogénesis, como se observa en los animales que expresaban anormalmente *Pax4* en células glucagón<sup>+</sup> [Collombat et al., 2009]. Sin embargo, la confirmación de esta hipótesis requeriría un trabajo adicional. De manera interesante, se observaron numerosas células en proliferación en los páncreas mutantes para *Arx*. Estas se detectaron en su mayoría en el tapiz ductal, en vez de dentro del islote. Además, también se detectaron células que reactivaron la expresión del gen del desarrollo y pro-endocrino *Ngn3* en la misma localización que se observó en los animales que se sometieron a ligadura de los conductos pancreáticos [Xu et al. 2008] o con la expresión anormal forzada de *Pax4* en las células  $\alpha$  [Collombat et al., 2009]. Del mismo modo, también se descubrió que se expresaba de manera ectópica en la misma localización un objetivo de *Ngn3*, *Rfx6*, lo que sugiere una recapitulación de, al menos, una parte del programa de diferenciación endocrina. Además, se observó un número incrementado de células somatostatina<sup>+</sup> en el polo del islote muy cerca de estos conductos. En conjunto, estos resultados apoyan la noción de que, tras la conversión de las células  $\alpha$  en células similares a  $\beta$ , se activan mecanismos compensatorios y dan como resultado la proliferación de células del tapiz ductal, la reexpresión de *Ngn3*, así como la expresión ectópica de *Rfx6*, y la adquisición de una identidad de células endocrinas. La validación de tal concepto requeriría el seguimiento inducible del linaje de las células que expresan *Ngn3/Rfx6*. Sin embargo, debido al uso del sistema Cre/Lox para inactivar *Arx* en estos modelos animales, no se pudo usar para seguir la progenie de estas células.

Aunque los experimentos de seguimiento del linaje permitieron concluir que las células  $\alpha$  neogeneradas continuamente se pueden convertir en células similares a  $\beta$  tras la inactivación de *Arx*, sigue sin estar claro el destino/origen de las células somatostatina<sup>+</sup> supernumerarias. Se pudieron concebir tres alternativas probables: (1) las células que reexpresan *Ngn3* podrían pasar a través de una fase de transición de expresión de *glucagón* antes de adoptar una de las diferentes identidades de las células endocrinas, (2) las células que reexpresan *Ngn3* podrían adoptar preferentemente un destino de célula  $\alpha$  para sustituir las convertidas y posteriormente adoptar un fenotipo de células similares a  $\beta$  tras la deficiencia de *Arx*, y las células extra somatostatina<sup>+</sup> detectadas corresponderían a células que han escapado a este favorecimiento del linaje, (3) las células que reexpresan *Ngn3* podrían dar lugar a los diferentes subtipos de células endocrinas, como se observa durante el transcurso del desarrollo, y varias de las células somatostatina<sup>+</sup> neo-generadas se convertirían posteriormente en células similares a  $\alpha$  para compensar su pérdida (antes de la adquisición de una identidad de células similares a  $\beta$  tras la inactivación de *Arx*). Aunque la primera alternativa se podría descartar basándose en la ausencia de marcaje con  $\beta$ -gal de las células somatostatina<sup>+</sup> en el seguimiento del linaje de las células glucagón<sup>+</sup>, la discriminación entre las últimas hipótesis esperará la generación de herramientas genéticas adecuadas para seguir la progenie de las células somatostatina<sup>+</sup> o PP<sup>+</sup>. De forma similar, será necesario un trabajo adicional para proporcionar pruebas concluyentes del destino/papel de las células que reexpresan *Ngn3*.

La inactivación de *Arx* en las células  $\alpha$  puede invertir las consecuencias de la diabetes inducida por toxinas: En un esfuerzo continuo para asegurar la identidad de las células similares a  $\beta$  suplementarias observadas en los ratones Glu-*Arx*KO y Dox<sup>+</sup> IndGlu-*Arx*KO, se monitorizaron sus parámetros fisiológicos y se llevaron a cabo ensayos funcionales, que incluyen medidas de los niveles de glucosa y/o insulina tras exposiciones a glucosa o insulina. En todos los casos, los resultados apoyan la noción de una masa incrementada de células similares a  $\beta$  capaces de responder a diferentes exposiciones. Es digno de mención que, a pesar de una hiperplasia de células similares a  $\beta$ , se descubrió que estos animales exhibieron una glucemia basal normal y no exhibieron resistencia a insulina, lo que sugiere un mecanismo de retroalimentación que permite una regulación óptima a pesar de un número incrementado de células similares a  $\beta$ . De manera importante, los análisis demostraron que tales células similares a  $\beta$  pueden sustituir funcionalmente a sus homólogos endógenos tras la inactivación de las células  $\beta$  inducida por estreptozotocina, y de ese modo previenen la muerte del animal o la hiperglucemia crónica. De manera interesante, los datos sugieren que tales procesos regenerativos pueden conducir a una reposición de la masa de células  $\beta$ , y de ese modo permitir la supervivencia del animal, incluso cuando se desencadena de manera concomitante con una hiperglucemia mediada por toxinas. Esto sugiere una neogénesis relativamente eficaz y rápida de células similares a  $\beta$ . Así, los hallazgos sugieren que la simple pérdida del gen *Arx* en las células  $\alpha$  es suficiente para iniciar un ciclo continuo de neo-formación de células  $\alpha$  y su conversión en células similares a  $\beta$ , y de ese modo conduce a la regeneración de una masa de células similares a  $\beta$  funcionales, un concepto importante en el contexto de la investigación de la diabetes.

*Arx* como pieza principal en la neogénesis de células similares a  $\beta$ : Como se mencionó previamente, en varias células productoras de glucagón Glu-*Arx*KO y Dox<sup>+</sup> IndGlu-*Arx*KO, se observó una expresión ectópica de *Pax4*. Aunque la conversión aparentemente rápida de células  $\alpha$  en células similares a  $\beta$  no permitió observar esta expresión anormal en todas las células *Arx*<sup>+/−</sup> glucagón<sup>+</sup>, se podría plantear la hipótesis de que la reexpresión de *Pax4* en las células  $\alpha$  podría contribuir, al menos en parte, a su conversión en células similares a  $\beta$  como se informó previamente [Collombat et al., 2009]. Así, para determinar de manera concluyente si la expresión forzada de *Pax4* o la inactivación de *Arx* está en el origen de la conversión de las células glucagón<sup>+</sup> en células similares a  $\beta$ , se generó un modelo animal que permitió la inactivación de ambos genes en las células glucagón<sup>+</sup>. De manera interesante, se observaron alteraciones fenotípicas similares a las de los animales deficientes de *Arx* o que expresaban anormalmente *Pax4* [Collombat et al., 2009], lo que incluye una hiperplasia de células insulina<sup>+</sup>, un aumento del número de islotes, y una localización preferente de células distintas de  $\beta$  cercanas a los conductos. Vale la pena indicar que se observaron varias células insulina<sup>+</sup> *Pax4*<sup>+</sup> en estos páncreas mutantes dobles, lo que proporciona

información sobre su origen, y por tanto indica que derivaron de células productoras de glucagón. Así, estos resultados demuestran que *Pax4* es prescindible en estos procesos de regeneración, y permiten concluir que *Arx* representa el factor principal que permite la conversión de las células  $\alpha$  en células similares a  $\beta$  y su regeneración posterior. Por lo tanto, se propone que el desarrollo de terapias dirigidas a inactivar/inhibir *Arx* en las células  $\alpha$  potencialmente podría abrir nuevas posibilidades en la investigación de la diabetes y/o ayudar en el diseño de protocolos de diferenciación de células  $\beta$  eficaces en el contexto de la investigación de células madre.

## EJEMPLO 2: INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN DE *ARX*

### Materiales y Métodos

**Manipulaciones de ratones:** Se realizaron experimentos de seguimiento de linaje cruzando animales Glucagón-Cre [Gu et al., 2002; Ashery-Padan et al., 2006; Herrera 2000], Ngn3-CreER [Gu et al., 2002] y HNF-CreER [Gu et al., 2002] con la línea de ratones ROSA26- $\beta$ -Gal [Soriano 1999]. Se administró GABA (Sigma) mediante inyecciones intraperitoneales de una disolución 50  $\mu$ M recién preparada una vez por semana. Se disolvió tamoxifeno (TAM, Sigma) en aceite de maíz a una concentración de 20 mg/ml y se administró mediante una sonda. Para evaluar la proliferación celular tras la adición de GABA, se trató a ratones WT con GABA y posteriormente con BrdU durante 10 días antes del examen. Se detectaron las células que habían incorporado BrdU durante la replicación del ADN mediante inmunohistoquímica (Invitrogen).

**Inmunohistoquímica:** Los tejidos se fijaron en un 4% de PFA durante 30 min a 4 °C, se incrustaron en parafina y se aplicaron cortes de 8  $\mu$ m a los portaobjetos. Estos cortes se ensayaron como se describió previamente [Collombat et al., 2003]. Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: anti-insulina policlonal de conejillo de Indias (1/500-Linco), anti-glucagón (1/500-Millipore), anti-glucagón monoclonal de ratón (1/500-Sigma), anti-BrdU (1/40-Roche), anti-E-cadherina (1/200-BD Transduction Lab), anti-somatostatina de rata (1/250-Millipore), anti-Glut2 de conejillo (1/5000), anti-PC1/3 (1/500-Millipore), anti-Nkx6.1 (1/3000-Novonordisk), anti-Pdx1 (1/1000), anti-NeuroD1 (1/200-Millipore), anti-Ngn3 (1/500-Abgent), anti- $\beta$ -galactosidasa (1/10000-Millipore), anti-vimentina de pollo (1/5000-Millipore), anti-osteopontina de cabra (1/200-R&D Systems). Los anticuerpos secundarios (1/1000 - Molecular Probes) usados fueron: 594- y 488-alexa anti-ratón; 594- y 488-alexa anti-conejillo; 594- y 488-alexa anti-conejillo de Indias; 488-alexa anti-rata; 594- y 488-alexa anti-cabra; 594- y 488-alexa anti-pollo. Las fotografías se procesaron mediante el uso de ZEISS Axioimager Z1 y LEICA DM 6000 B. Para fines de cuantificación, se contaron manualmente las células teñidas en cada décimo corte.

**Experimentos de seguimiento del linaje basados en  $\beta$ -galactosidasa:** Los tejidos pancreáticos se aislaron y se fijaron durante 30 min a 4 °C en una disolución que contenía un 1% de formaldehído, 0,2% de glutaraldehído, 0,02% de NP40. Los tejidos se deshidrataron en un 25% de sacarosa durante la noche a 4 °C. Antes de cortarlos, los tejidos se incrustaron en un medio de congelación. Para la determinación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, los tejidos se lavaron en PBS y después se incubaron durante la noche en una disolución de tinción ( $K_3Fe(CN)_6$  500 mM,  $K_4Fe(CN)_6$  250 mM,  $MgCl_2$  0,5 M, 40 mg/ml de X-gal en DMF).

**Recuentos de células:** Se llevaron a cabo análisis cuantitativos contando los píxeles coloreados en cortes (inmuno-) teñidos de páncreas mediante el uso del programa informático Photoshop. De manera específica, cada 10° corte se procesó mediante el uso de los mismos ajustes para todos los animales y genotipos.

**Exposición y medida de los niveles de glucosa en sangre:** Para fines de exposición, los animales se sometieron a ayuno durante 16 h y se les inyectó de manera intraperitoneal glucosa (2 g/kg de peso corporal). Se midieron los niveles de glucosa en sangre en los momentos indicados tras la inyección con un glucómetro ONETOUCH Vita (Life Scan, Inc., CA).

**Inducción de la diabetes mediada por estreptozotocina:** Para inducir la hiperglucemia, se disolvió STZ (Sigma) en tampón de citrato sódico 0,1 M (pH 4,5), y se administró una única dosis de manera intraperitoneal (100 mg/kg) en 10 min desde la disolución. La progresión de la diabetes se evaluó mediante la monitorización de los niveles de glucosa en sangre de los ratones.

**Análisis de datos:** Todos los valores se representan como la media  $\pm$  EEM, y se consideran significativos si  $P < 0,05$ . Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA.

### Resultados

**El tratamiento de ratones WT con GABA induce una hiperplasia de células productoras de insulina, y tales células expresan un fenotipo de células  $\beta$ :** Para determinar las consecuencias de la administración de GABA, se llevaron a cabo análisis inmunohistoquímicos. Los ratones WT tratados con GABA mostraron una hipertrofia de islotes en comparación con los ratones de control, que fue el resultado de un aumento del número de células insulina<sup>+</sup> (Tabla 2). Este incremento del tamaño de los islotes pareció depender de la duración del tratamiento con GABA (Tabla 1). También se observó un incremento del número de islotes en los ratones tratados con GABA en comparación con los controles, y este incremento pareció ser independiente de la duración del tratamiento con GABA (Tabla 1). Además del número incrementado de islotes y células insulina<sup>+</sup>, los ratones WT tratados con GABA mostraron contenidos incrementados de células glucagón<sup>+</sup> y somatostatina<sup>+</sup> (Tabla 2) en comparación con sus homólogos sin tratar. Por

último, se descubrió que los animales tratados con GABA fueron viables, sanos y fértiles, su esperanza de vida y glucemia basal permanecieron dentro de los intervalos normales, independientemente de la administración de GABA (Tabla 1).

5 Tabla 1: Comparación cuantitativa del número de islotes entre los animales tratados con GABA y los controles de igual edad (n = 3 para cada grupo).

Duración del tratamiento con GABA	Edad de tratamiento con GABA	Esperanza de vida	Glucemia basal	Recuento de islotes	Tamaño de islotes
1 mes	2,6 m	normal	126	x 2,19 ± 0,04 ***	x 1,04 ± 0,15
2 meses	2,6 m	normal	134	x 1,86 ± 0,05 ***	x 2,15 ± 0,22 **
3 meses	2,6 m	normal	142	x 1,80 ± 0,03 ***	x 3,49 ± 0,11 **

\*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01; datos analizados estadísticamente mediante un ANOVA unidireccional; todos los datos representados como la media ± EEM. El examen de los ratones WT tratados con GABA durante 2 o 3 meses reveló un incremento del número de células que expresaban hormonas y del número de islotes. Se descubrió que la esperanza de vida y la glucemia basal (monitorizadas semanalmente) estuvieron dentro de los intervalos normales, en comparación con los controles, en todas las condiciones analizadas.

10

Tabla 2: Comparación cuantitativa del número de células que expresaban glucagón, insulina o somatostatina mediante recuento de píxeles entre animales tratados con GABA y controles de igual edad (n = 3 para cada grupo).

Duración del tratamiento con GABA	Recuento de células insulina <sup>+</sup>	Recuento de células glucagón <sup>+</sup>	Recuento de células somatostatina <sup>+</sup>
1 mes	x 1,04 ± 0,15	x 0,97	x 1,43
2 meses	x 2,15 ± 0,22 **	x 1,91	x 2,39
3 meses	x 3,49 ± 0,11 **	x 3,02	x 2,84

\*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01; datos analizados estadísticamente mediante un ANOVA unidireccional; todos los datos representados como la media ± EEM. El examen de los ratones WT tratados con GABA durante 2 o 3 meses reveló un incremento del número de células que expresaban hormonas y del número de islotes. Se descubrió que la esperanza de vida y la glucemia basal (monitorizadas semanalmente) estuvieron dentro de los intervalos normales, en comparación con los controles, en todas las condiciones analizadas.

15

Para confirmar la identidad de las células insulina<sup>+</sup> en los páncreas tratados con GABA, se ensayó la expresión de varios genes marcadores de células endocrinas mediante inmunohistoquímica en comparación con los controles sin tratar. Estos análisis revelaron que las células que expresaban insulina en los islotes tratados con GABA mostraron la mayoría de características de las células β verdaderas. De hecho, estas células expresaron uniformemente marcadores fiables de células β, tales como los factores de transcripción Pdx1, Nkx6.1 y NeuroD1, el transportador de glucosa específico de células β Glut 2, la prohormona convertasa 1/3 (PC1/3), así como el marcador pan-endocrino Pax6. También se descubrió que estas células carecieron de los determinantes de las células distintas de β, tales como glucagón y somatostatina.

20

25

En conjunto, los datos demuestran que la administración de GABA a ratones WT conduce a una hipertrofia progresiva de islotes y a la neogénesis de islotes. Estos islotes hipertróficos son principalmente la consecuencia de una hiperplasia de células insulina<sup>+</sup> (dichas células expresan muchas características de las células β verdaderas), así como de un incremento del contenido de células glucagón<sup>+</sup> y células somatostatina<sup>+</sup>.

30

El tratamiento con GABA puede inducir la conversión de células que expresan glucagón en células productoras de insulina: Para determinar el origen de la hipertrofia de los islotes en los ratones tratados con GABA, se llevaron a cabo análisis inmunohistoquímicos adicionales. Se observaron varios ejemplos, de islotes no relacionados, de células que co-expresaban insulina con glucagón. Esto sugiere que los procesos subyacentes en la neogénesis de células similares a β podrían requerir una fase de transición de expresión de glucagón. Para validar esta hipótesis, se usaron ratones Glu-Cre::Rosa26-lox-β-gal. Estos ratones, en los que las células que expresan glucagón están marcadas de manera irreversible, se trataron con una dosis elevada de estreptozotocina para inducir químicamente la diabetes, y después se les inyectó diariamente (o no) GABA una vez que fueron hiperglucémicos (glucemia de alrededor de 300 mg/dl). En los controles Glu-Cre::Rosa26-lox-β-gal (no tratados con GABA o estreptozotocina), mediante el uso de tinción de X-gal, se halló actividad de β-gal únicamente en las células de la zona del manto de los islotes, en la que se detectan clásicamente células que expresan glucagón. En los animales tratados con GABA (aislados 40 días tras la inyección de estreptozotocina), los islotes parecieron regenerados, y se observó un gran

35

40

número de células marcadas con  $\beta$ -gal localizadas en el centro de los islotes. Los análisis inmunohistoquímicos adicionales mediante el uso de anticuerpos generados hacia insulina y  $\beta$ -galactosidasa proporcionaron una mayoría de células positivas para insulina y  $\beta$ -galactosidasa. Es importante indicar que también se observan dichas células positivas dobles (en menor proporción) en los animales Glu-Cre::Rosa26-lox- $\beta$ -gal tratados con GABA no sometidos a administración de estreptozotocina. En conjunto, los resultados proporcionan pruebas concluyentes de que, tras la administración de GABA y tras el tratamiento con estreptozotocina, se regeneran células similares a  $\beta$ , que derivan de células que antes expresaban la hormona glucagón.

Origen ductal de la hipertrofia de islotes: A pesar de su conversión en células similares a  $\beta$ , se detectan sistemáticamente células glucagón<sup>+</sup>, lo que sugiere que estas se regeneran continuamente. Así, para comprender mejor los mecanismos subyacentes en estos procesos, se administró el análogo de timidina 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) para detectar de manera activa las células en replicación. Se observó un número bajo de células marcadas con BrdU (principalmente células que expresaban insulina) en los ratones de control. De manera interesante, la mayoría de células BrdU<sup>+</sup> se hallaron predominantemente localizadas en el tapiz ductal y en el epitelio ductal de los páncreas WT tratados con GABA. Además, las células glucagón<sup>+</sup> y somatostatina<sup>+</sup> no estuvieron distribuidas uniformemente en el manto de los islotes, sino que se hallaron agrupadas en un polo del islote, adyacentes a los conductos cercanos, a diferencia de los controles, en los que la distribución de las células distintas de  $\beta$  se halló dispersada en el manto de los islotes. La localización atípica de las células distintas de  $\beta$  y la proliferación celular incrementada observada en el medio ductal, cerca de los islotes, sugiere que existe una supuesta fuente de precursores endocrinos en esa región.

La detección de un pequeño número de células que co-expresan insulina y el biomarcador específico de los conductos osteopontina en los islotes es coherente con esta hipótesis. Para confirmar su ontogenia ductal, se llevaron a cabo experimentos de seguimiento del linaje de las células ductales en HNF1 $\beta$ -CreER::Rosa26-lox- $\beta$ -gal tratados con GABA y Tam. Tras la tinción X-gal, se detectó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en las células localizadas en el núcleo de los islotes donde residen clásicamente las células insulina<sup>+</sup>, mientras solamente se marcaron los conductos con  $\beta$ -galactosidasa en los controles. Estos resultados indican que las células ductales contribuyen potencialmente a la hiperplasia de las células de los islotes en los animales tratados con GABA.

Reexpresión de Ngn3 y detección de una estructura similar al mesénquima en los ratones tratados con GABA: Para investigar adicionalmente la hipótesis de que hay localizada una fuente potencial de células precursoras en la región ductal, se examinó si se expresaron marcadores de células precursoras. Por lo tanto, se ensayaron páncreas tratados con GABA con respecto al gen pro-endocrino del desarrollo Ngn3 mediante el uso de inmunohistoquímica. Se observó una reactivación de Ngn3 en el medio ductal (tapiz ductal y epitelio ductal) de los páncreas tratados con GABA, mientras no se detectó la expresión de Ngn3 en los animales de control. Es interesante observar que unas pocas células de los islotes también expresan Ngn3 en los animales tratados con GABA. Se llevaron a cabo experimentos de seguimiento del linaje para determinar la contribución de las células que reexpresaban Ngn3 a la masa suplementaria de células endocrinas. En los ratones Ngn3-CreER::Rosa26-lox- $\beta$ -gal tratados con GABA y Tam, se observó un gran número de células marcadas para  $\beta$ -Gal, tanto en el tapiz ductal como en los islotes, mientras los controles parecieron negativos para  $\beta$ -galactosidasa.

De manera interesante, se observó una región densa en células que se parecía al mesénquima localizada cerca de los islotes y alrededor de los conductos. En un esfuerzo por caracterizar mejor esas células, se emprendieron análisis inmunohistoquímicos. Vimentina, el marcador mesenquimatoso canónico, se halló reexpresado de manera generalizada en los agrupamientos densos en células alrededor de los conductos y cerca de los islotes, la misma región en la que se descubrió que se reexpresaba Ngn3. Además, se propuso la conversión de células vimentina<sup>+</sup> en células insulina<sup>+</sup> o glucagón<sup>+</sup> por la presencia de un pequeño número de células positivas dobles. En conjunto, estos datos indican que las células que reexpresaban Ngn3 en los ratones tratados con GABA adoptan finalmente una identidad de células endocrinas, y tal proceso implica posiblemente una conversión de células mesenquimatosas en endocrinas.

Se puede regenerar una masa de células  $\beta$  funcionales tras la diabetes inducida químicamente en animales tratados con GABA: Para determinar si las células insulina<sup>+</sup> neo-formadas podrían sustituir funcionalmente a las células  $\beta$  endógenas, se inyectó a animales WT una dosis elevada de estreptozotocina para anular la masa de células  $\beta$  endógenas. Antes de alcanzar niveles hiperglucémicos letales (aproximadamente 300 mg/dl), los ratones se trataron con GABA o agua (controles). Mientras los ratones de control se hicieron diabéticos rápidamente y murieron de hiperglucemia extrema, se observó una recuperación estable tras un máximo de glucemia en los animales WT tratados con GABA (Figura 4A).

Se examinó el grado de respuesta a glucosa de los ratones tratados con GABA supervivientes. Tras la exposición a una dosis elevada de glucosa, se descubrió que estos animales exhibieron una respuesta mejorada con una elevación inferior de la glucemia y una vuelta más rápida a la euglucemia en comparación con los controles (no tratados con GABA o estreptozotocina - Figura 4B).

Mediante los análisis inmunohistoquímicos, se observó una pérdida clásica de células  $\beta$  poco después del tratamiento con estreptozotocina en comparación con los controles tratados con citrato sódico, y la única tinción positiva para insulina correspondió a la insulina liberada de las células  $\beta$  destruidas. Se demostró que se



regeneraron progresivamente células insulina<sup>+</sup> tras la pérdida de las células  $\beta$  en animales WT tratados con GABA, mediante análisis inmunohistoquímicos en diferentes momentos.

Los datos proporcionan pruebas de que las células similares a  $\beta$  neo-generadas son funcionales y pueden contrarrestar la diabetes inducida químicamente.

## 5 DISCUSIÓN:

Los informes previos han demostrado un efecto regenerativo de GABA en los modelos de ratón TD1. Sin embargo, que se sepa, no se ha establecido una conexión entre GABA y la regeneración de células  $\beta$  mediada por células  $\alpha$ . En este estudio, se intentó investigar si GABA puede ser un inductor químico potencial de este proceso. Mediante el uso del tratamiento con GABA en ratones WT y varias líneas de ratón que permiten el seguimiento del linaje, se informa de que el tratamiento de ratones WT con GABA da como resultado islotes hipertróficos debido a la hiperplasia de células  $\beta$ , células  $\alpha$  y células  $\delta$ . Se demuestra que estas alteraciones fenotípicas implican la proliferación de células en el epitelio/tapiz ductal acompañada de la reexpresión del factor pro-endocrino Ngn3. Aprovechando las herramientas de seguimiento del linaje, también se demuestra que una mayoría de las células adicionales observadas tras el tratamiento con GABA han pasado a través de una etapa de expresión de glucagón, Ngn3 y Hnf1 $\beta$ , lo que confirma adicionalmente los hallazgos. Además, las células recién formadas son funcionales y pueden invertir la diabetes inducida químicamente tras el tratamiento con GABA. En conjunto, estos hallazgos apoyan la noción de que GABA puede inducir la regeneración de células  $\beta$  a través de un proceso de conversión de células  $\alpha$  en células  $\beta$ .

El tratamiento con GABA induce a las células  $\alpha$  a convertirse en células  $\beta$ : Las alteraciones fenotípicas observadas en los ratones WT tratados con GABA durante 1 a 3 meses son reminiscentes de las halladas en los animales con expresión ectópica de Pax4 en las células que expresan glucagón. De hecho, el tratamiento de ratones WT con GABA induce una hipertrofia de islotes acompañada de un aumento del contenido de células productoras de hormonas, y un incremento del número de islotes. Una posibilidad para el origen de los islotes sobredimensionados podría ser la proliferación de las células  $\beta$  endógenas, y esta hipótesis está apoyada por los informes de que GABA incrementa la replicación de células  $\beta$  [Soltani et al., 2011; Ligon et al., 2007]. Sin embargo, la ausencia de un incremento significativo de la proliferación de células  $\beta$  en los ratones tratados con GABA respecto del tamaño de los islotes (datos no mostrados) sugiere que el incremento de la población de células  $\beta$  puede surgir de otra fuente. Teniendo en cuenta el hecho de que GABA puede convertir las células  $\alpha$  en células similares a  $\beta$  *in vitro*, se usó la línea de ratones Glu-Cre::Rosa26-lox- $\beta$ -gal para determinar el destino de las células productoras de glucagón tras la adición de GABA. Los experimentos de seguimiento del linaje proporcionaron pruebas de la conversión de células  $\alpha$  en células  $\beta$  mediada por GABA *in vivo*, lo que dio como resultado islotes hipertróficos. Además, la detección continuada de células glucagón<sup>+</sup> a pesar de su conversión sugiere que se desencadenan mecanismos compensatorios para regenerar estas células. De hecho, se observó una renovación de células  $\alpha$  como resultado de las alteraciones en la señalización de glucagón o la escasez de glucagón en los estudios previos. Si, en este caso, la hipertrofia de los islotes es la consecuencia de la reducción del glucagón y la neogénesis de células  $\alpha$  posterior, la suplementación con glucagón debería dificultar este proceso. Para verificar esta teoría, se podría administrar glucagón a animales WT tratados con GABA para observar si esto podría disminuir el número incrementado de células que expresan hormonas.

Origen de la hipertrofia de islotes: Por lo que se refiere al origen de las células similares a  $\alpha$  neo-generadas, la observación de una localización preferente de esas células en un polo del islote, adyacente a los conductos, la reexpresión de Ngn3 y la proliferación incrementada de células en el medio ductal apunta a una supuesta fuente de células que expresan glucagón. Además, se observó que pocas células de los islotes co-expresaron Ngn3 y glucagón/insulina (datos no mostrados), lo que sugiere además que esas células pasaron a través de una fase de reexpresión potencial de Ngn3. El seguimiento de las células HNF1 $\beta$ <sup>+</sup> y Ngn3<sup>+</sup> en los animales tratados con GABA apoyó esta hipótesis. De hecho, se detectó actividad de  $\beta$ -galactosidasa en los islotes en ratones Ngn3-CreER::Rosa26-lox- $\beta$ -gal y HNF1 $\beta$ -CreER::Rosa26-lox- $\beta$ -gal tratados con GABA, a diferencia de los animales de control. Sin embargo, los análisis inmunohistoquímicos adicionales mediante el uso de anticuerpos generados hacia las hormonas endocrinas y  $\beta$ -galactosidasa deberían confirmar el concepto de que las células que expresan glucagón (y posteriormente las células productoras de insulina) pasaron a través de una fase de transición HNF1 $\beta$ <sup>+</sup> y Ngn3<sup>+</sup>. Los experimentos adicionales mediante el uso de una línea de ratones con inactivación condicional de Ngn3 deberían determinar la contribución de las células que reexpresan Ngn3 a la regeneración de las células glucagón<sup>+</sup>. Además de la reexpresión de Ngn3, se observó la expresión de un marcador mesenquimatoso, vimentina, en el mismo medio ductal, y unas cuantas células vimentina<sup>+</sup> glucagón<sup>+</sup>/insulina<sup>+</sup> en los islotes. En conjunto, los resultados sugieren que la generación de nuevas células epiteliales/endocrinas puede requerir la conversión de células similares al mesénquima. Sin embargo, sigue sin determinarse si la neogénesis de las células de los islotes pasa a través de la activación de una ruta mesenquimatosa. Además, se observó un número incrementado de células somatostatina<sup>+</sup> en estrecha proximidad a los conductos. Por lo tanto, se podría plantear la hipótesis de que estas células se regeneraron tras el tratamiento con GABA antes de su conversión en células productoras de insulina. El seguimiento de las células somatostatina<sup>+</sup> debería proporcionar respuestas, sin embargo, que se sepa, todavía se tiene que generar una línea de ratones Somatostatina-Cre que funcione.

El tratamiento con GABA puede revertir la diabetes inducida por toxinas: Se demostró que, tras el tratamiento con estreptozotocina, las células similares a  $\beta$  pueden sustituir funcionalmente y progresivamente a sus homólogos endógenos. Los ratones tratados con GABA supervivientes se sometieron a otra ronda de estreptozotocina (datos no mostrados), sin embargo, se descubrió que esos animales no fueron sensibles a STZ. Una posible explicación es que GABA ejerce un efecto protector en la masa de células similares a  $\beta$  como mencionó Soltani *et al.*, 2011, o que las células similares a  $\beta$  neo-generadas todavía expresan algunas características de las células  $\alpha$ . Los mecanismos implicados se tendrán que investigar adicionalmente.

Mecanismos moleculares implicados en la conversión de células  $\alpha$  en células  $\beta$ : Como se mencionó previamente, Arx y Pax4 son mutuamente inhibitorios a nivel transcripcional [Collombat *et al.*, 2005]. Recientemente, se ha demostrado que tras la expresión anormal de Pax4, las células embrionarias productoras de glucagón se pueden convertir en células similares a  $\beta$  en ratones [Collombat *et al.*, 2009]. En la presente memoria se ha demostrado que la inactivación de Arx en las células que expresan glucagón puede desencadenar este proceso. GABA puede inducir una disminución de la expresión del mRNA de Arx *in vitro* en la línea celular  $\alpha$ -TC1-6 (Figura 5).

#### Referencias:

15 A lo largo de esta solicitud, las diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan en la presente memoria como referencia en la presente descripción.

Ashery-Padan R, Zhou X, Marquardt T, Herrera P, Toubé L, *et al.* (2004) Conditional inactivation of Pax6 in the pancreas causes early onset of diabetes. *Developmental biology* 269: 479-488.

20 Belteki, G., Haigh, J., Kabacs, N., Haigh, K., Sison, K., Costantini, F., Whitsett, J., Quaggin, S.E., y Nagy, A. (2005). Conditional and inducible transgene expression in mice through the combinatorial use of Cre - mediated recombination and tetracycline induction. *Nucleic Acids Res* 33, e51.

Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sørensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, *et al.* Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 2003; 17: 2591-603.

25 Collombat P, Hecksher-Sørensen J, Broccoli V, Krull J, Ponte I, Mundiger T, *et al.* The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development* 2005; 132: 2969-80.

Collombat P, Hecksher-Sørensen J, Krull J, Berger J, Riedel D, Herrera PL, *et al.* Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J Clin Invest* 2007; 117: 961-70.

30 Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, *et al.* The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into  $\alpha$  and subsequently  $\beta$ -cells. *Cell* 2009; 138: 449-62.

Fulp, C.T., Cho, G., Marsh, E.D., Nasrallah, I.M., Labosky, P.A., y Golden, J.A. (2008). Identification of Arx transcriptional targets in the developing basal forebrain. *Hum Mol Genet* 17, 3740-3760.

35 Gómez R, Asnis N, Tannhauser SL, Barros HM (1999) GABA agonists differentially modify blood glucose levels of diabetic rats. *Japanese journal of pharmacology* 80: 327-331.

Gu G, Dubauskaite J, Melton DA (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129: 2447-2457.

Hancock, A.S., Du, A., Liu, J., Miller, M., y May, C.L. (2010). Glucagon deficiency reduces hepatic glucose production and improves glucose tolerance in adult mice. *Mol Endocrinol* 24, 1605-1614.

40 Hennighausen L, Wall RJ, Tillmann U, Li M, Furth PA (1995) Conditional gene expression in secretory tissues and skin of transgenic mice using the MMTV-LTR and the tetracycline responsive system. *J Cell Biochem* 59: 463-472.

Herrera PL. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 2000; 127: 2317-22.

45 Herrera PL, Huarte J, Zufferey R, Nichols A, Mermillod B, *et al.* (1994) Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12999-13003.

Kordowich S, Serup P, Collombat P, Mansouri A (2012) Generation of animals allowing the conditional inactivation of the Pax4 gene. *Transgenic Res* 21: 1215-1220.

Ligon B, Yang J, Morin SB, Ruberti MF, Steer ML (2007) Regulation of pancreatic islet cell survival and replication by gamma-aminobutyric acid. *Diabetologia* 50: 764-773.

50

- Mendu SK, Akesson L, Jin Z, Edlund A, Cilio C, et al. (2011) Increased GABA(A) channel subunits expression in CD8(+) but not in CD4(+) T cells in BB rats developing diabetes compared to their congenic littermates. *Molecular immunology* 48: 399-407.
- 5 Nolan AL, O'Dowd JF (2009). The measurement of insulin secretion from isolated rodent islets of Langerhans. *Methods Mol Biol.* 560:43-51.
- Perl AK, Wert SE, Nagy A, Lobe CG, Whitsett JA (2002) Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10482-10487.
- Powers AC, Efrat S, Mojsov S, Spector D, Habener JF, Hanahan D. (1990) Diabetes. 39(4):406-414. Proglucagon processing similar to normal islets in pancreatic alpha-like cell line derived from transgenic mouse tumor.
- 10 Quoix N, Cheng-Xue R, Guiot Y, Herrera PL, Henquin JC, et al. (2007) The GluCre-ROSA26EYFP mouse: a new model for easy identification of living pancreatic alpha-cells. *FEBS Lett* 581: 4235-4240.
- Sand FW, Hornblad A, Johansson JK, Loren C, Edsbacke J, et al. (2011) Growthlimiting role of endothelial cells in endoderm development. *Dev Biol* 352: 267-277.
- Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development* 1995; 121: 1569-1580.
- 15 Soltani N, Qiu H, Aleksic M, Glinka Y, Zhao F, Liu R, Li Y, Zhang N, Chakrabarti R, Ng T, Jin T, Zhang H, Lu WY, Feng ZP, Prud'homme GJ, Wang Q. GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 de julio de 2011; 108(28):11692-7.
- Soriano, P. Generalized LacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature Genetics* 1999; 21: 70-71.
- 20 Soyer J, Flasse L, Raffelsberger W, Beucher A, Orvain C, et al. (2010) Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development. *Development* 137: 203-212.
- Tian J, Dang H, Kaufman DL (2011) Combining antigen-based therapy with GABA treatment synergistically prolongs survival of transplanted ss-cells in diabetic NOD mice. *PLoS one* 6: e25337.
- Tokuyasu KT (1973) A technique for ultracytometry of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* 57: 551-565.
- 25 Wang S, Jensen JN, Seymour PA, Hsu W, Dor Y, et al. (2009) Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9715-9720.
- Xu X, D'Hoker J, Stange G, Bonne S, De Leu N, et al. (2008) Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132: 197-207.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *ex vivo* para la producción de una población de células beta pancreáticas, que comprende la etapa de:
- i) proporcionar una población de células alfa pancreáticas;
- 5 ii) inhibir la expresión o actividad de Arx en dicha población de células alfa pancreáticas; en el que la expresión de Arx se inhibe mediante el uso de un oligonucleótido de siARN, una ribozima, un oligonucleótido inverso, ácido gamma-amino butírico (GABA) o un agonista de receptores de GABA.
2. Un inhibidor de la expresión génica de Arx y un agente inmunosupresor para el uso en el tratamiento de la diabetes mejorando la supervivencia de las células beta pancreáticas regeneradas en un paciente que padece diabetes, en el que el inhibidor de la expresión génica de Arx es GABA o un agonista de receptores de GABA.
- 10 3. El inhibidor de la expresión génica de Arx y el agente inmunosupresor para el uso según la reivindicación 2, en el que el agente inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en azatioprina, ácido micofenólico, leflunomida, teriflunomida, metotrexato, FKBP/ciclofilina, tacrólimus, ciclosporina, pimecrólimus, abétimus, guspérimus, sirólimus, deforólimus y everólimus.
- 15

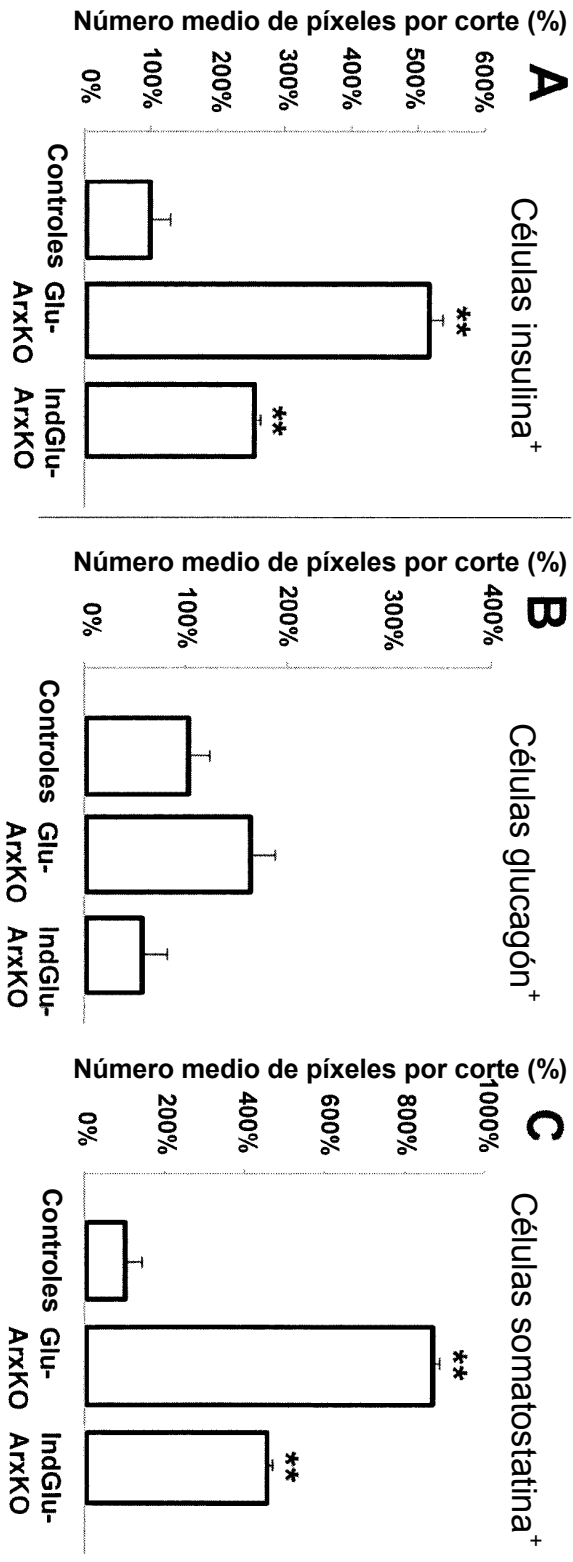


Figura 1

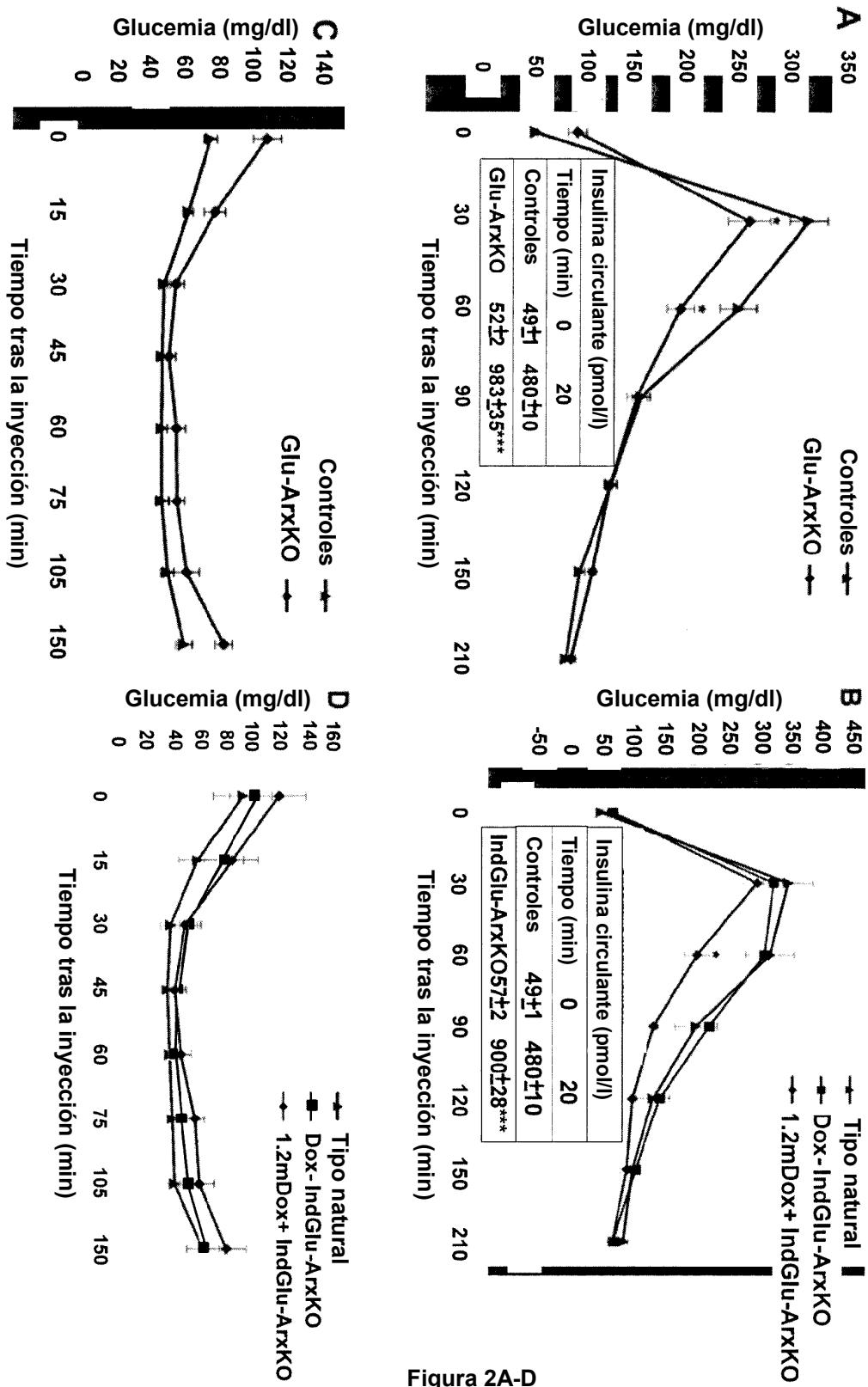


Figura 2A-D

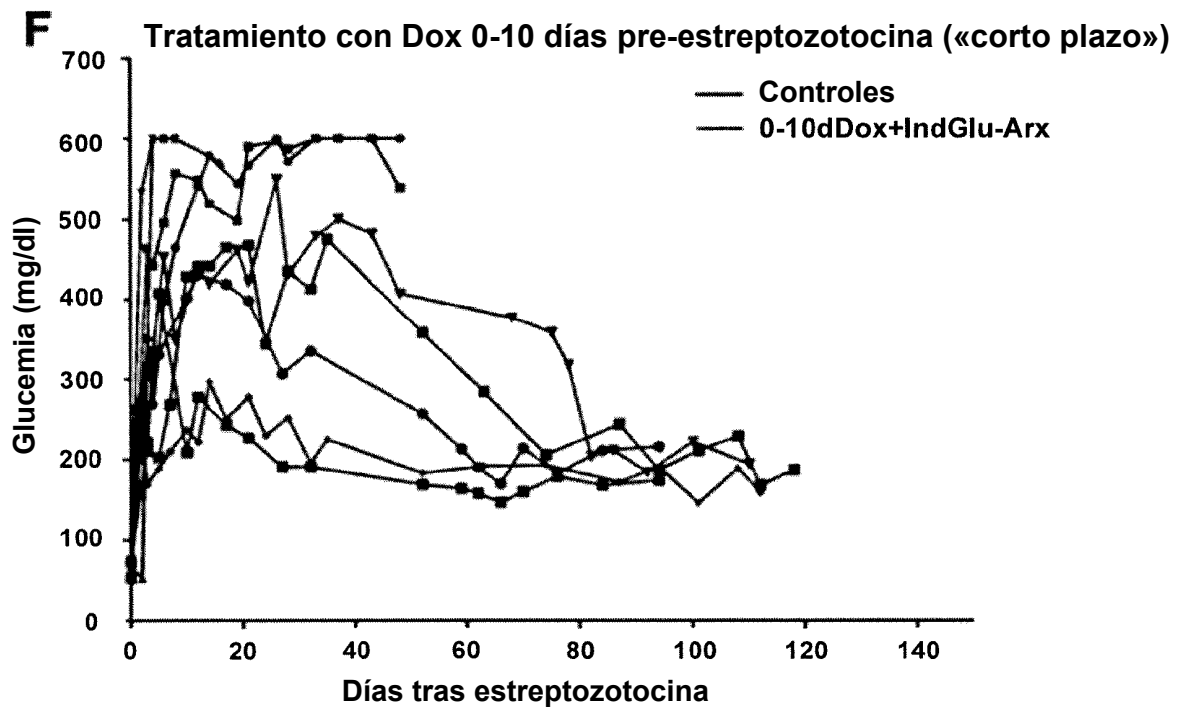
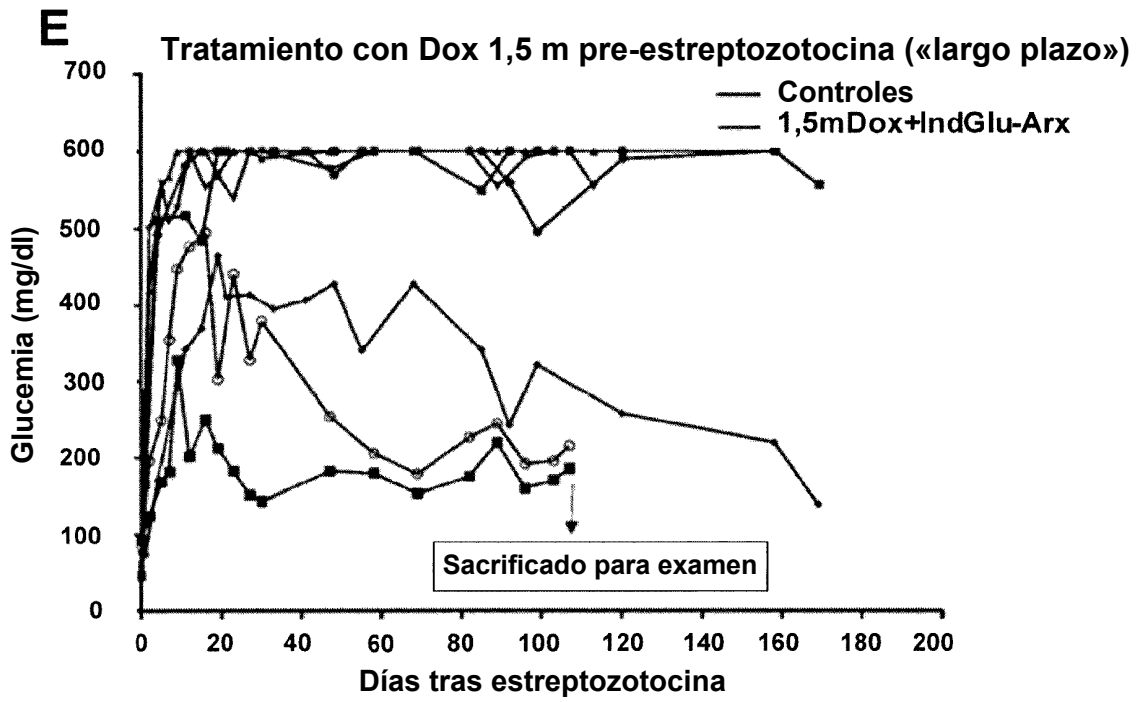


Figura 2E-F

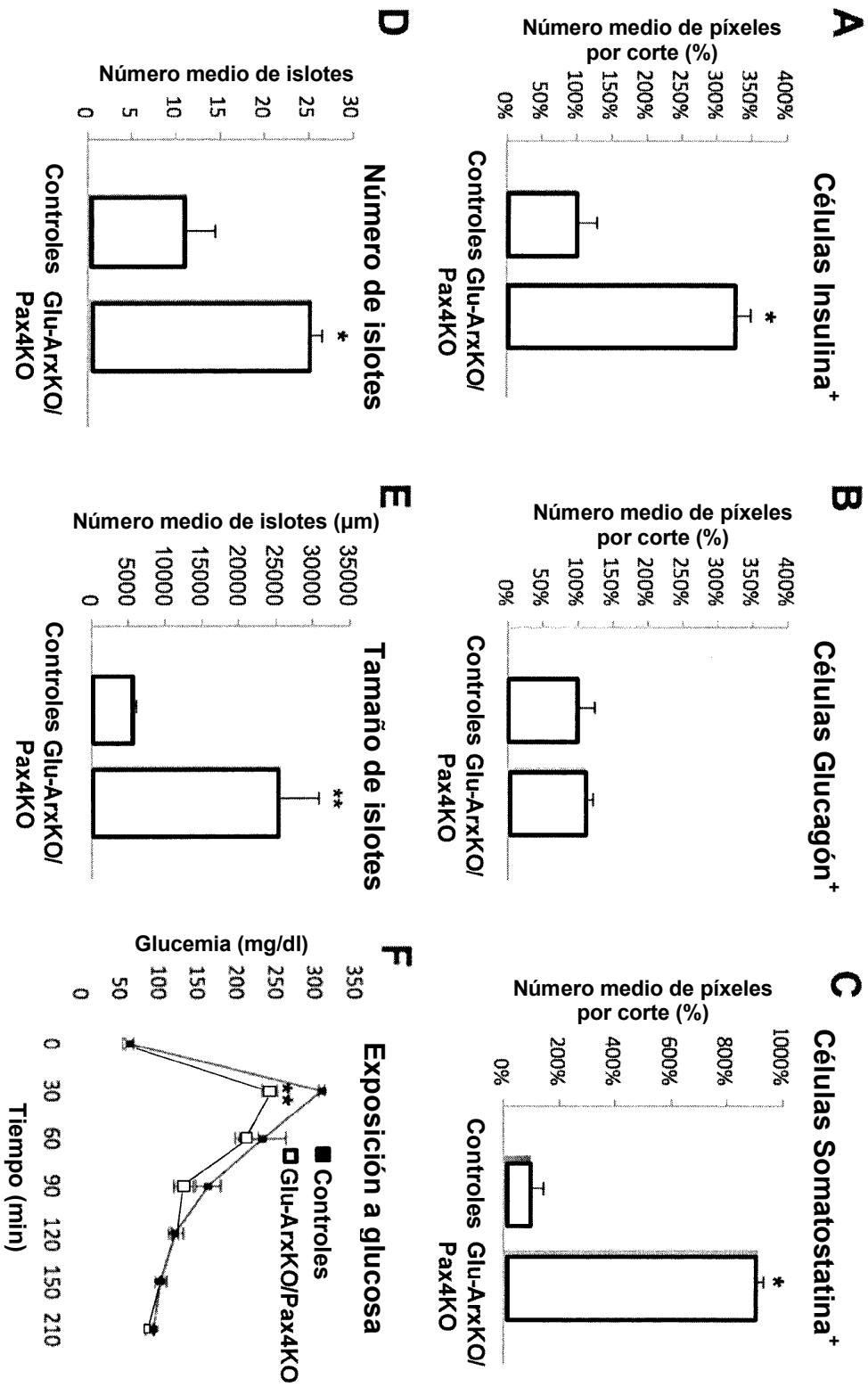


Figura 3



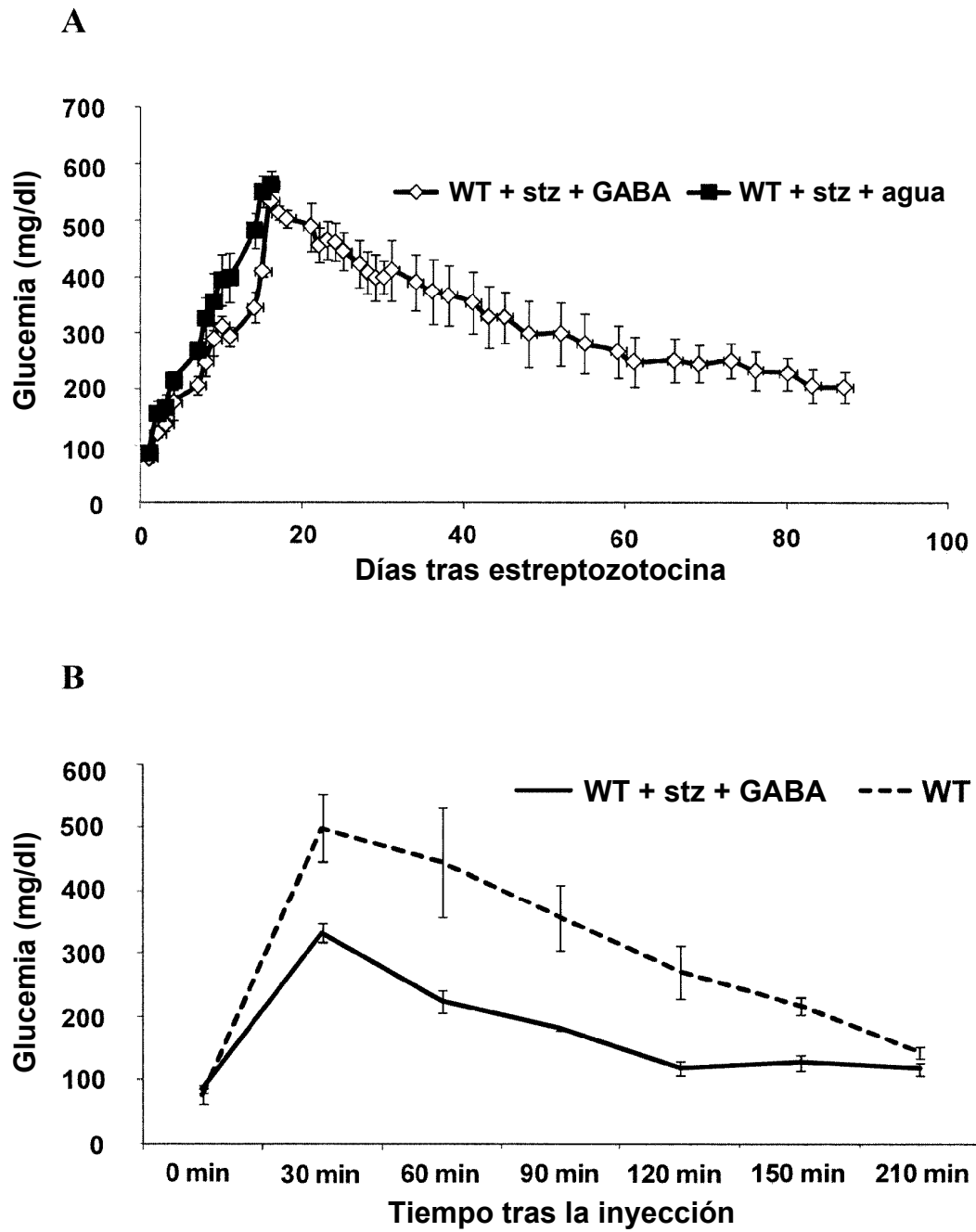


Figura 4

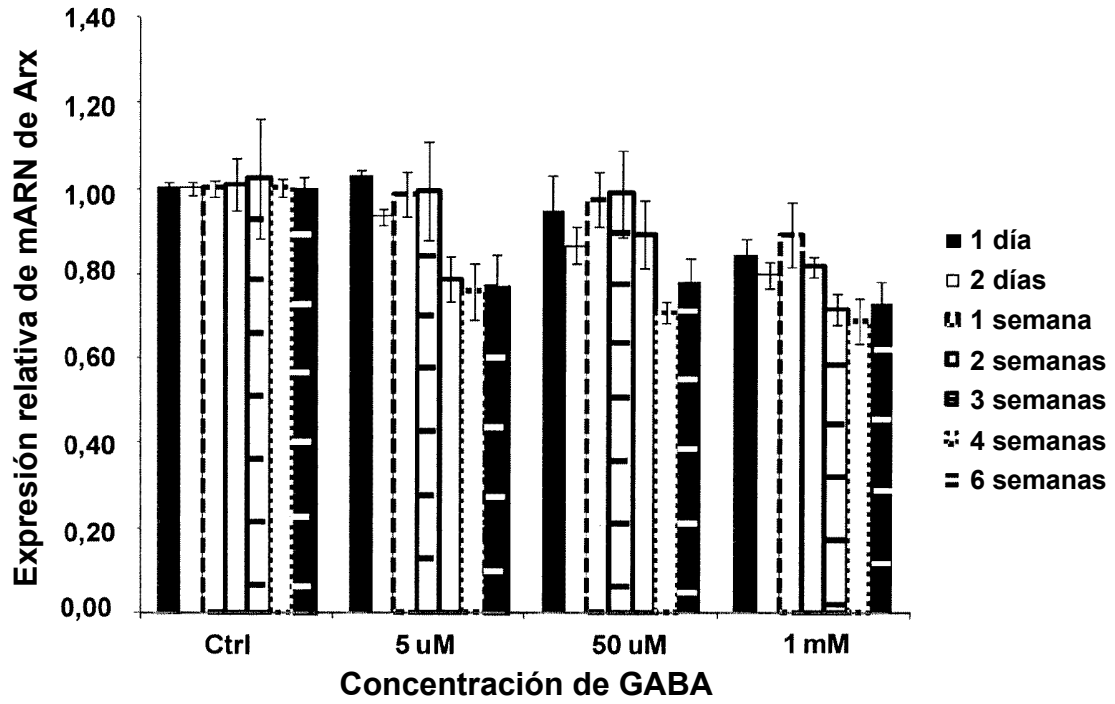


Figura 5