

## Plasticitat de la cèl·lula beta en l'obesitat

Nuria Palau Balañá

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

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

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



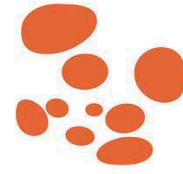
Departament de Medicina

Facultat de Medicina

## **PLASTICITAT DE LA CÈL·LULA BETA EN L'OBESITAT**

Tesi doctoral presentada per  
**Nuria Palau Balañá**  
per optar al títol de  
**doctora per la Universitat de Barcelona**





Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del doctor Ramon Gomis i del doctor Albert Barberà en el Laboratori de Diabetis i Obesitat de l'IDIBAPS

Dr. Ramon Gomis de Barbarà

Dr. Albert Barberà i Lluís

Nuria Palau Balañá

Barcelona, Maig 2010



*Als meus pares*



# AGRAÏMENTS



*L'emoció que se sent en fer el cim és indescriptible, però gaudir del camí en bona companyia és sense cap dubte molt millor.*





*En primer lloc voldria donar les gràcies als meus directors de tesi, al doctor Ramon Gomis, per haver-me donat l'oportunitat de fer la tesi doctoral en el seu grup de recerca, pel seu suport, la seva guia i l'interès que sempre ha mostrat en aquest projecte, i al doctor Albert Barberà, per haver-me escollit com la seva primera doctoranda i per tot el que m'ha ensenyat, en especial a ser una mica més optimista, la qual cosa és essencial a l'hora de fer investigació.*

*També voldria agrair a la doctora Joana Planas el seu cop de mà per iniciar el meu doctorat, sense el qual tot això no hauria estat possible.*

*Al llarg dels anys que he estat al Laboratori de Diabetis i Obesitat, que han estat uns quants, he tingut la sort de coincidir amb moltes persones, que amb la seva simpatia i companyonia, han fet que sempre em sentís encantada d'estar al seu costat i que l'ambient del laboratori fos immillorable.*

*Al Jordi Altirriba, la Maria Lucas, la Núria Marzo i la Marta Amigó, que s'han convertit en la meva segona família, els voldria agrair el gran suport que m'han donat en els moments més crítics i les infinites bones estones que hem compartit. Amb vosaltres fins i tot ho tornaria a repetir!!! (bé, potser en una altra vida). Altirriba, "germanet", gràcies per la teva paciència infinita, per donar-me un cop de mà sempre que t'ho he demanat, per les teves sempre interessants "batallitas" i "sabies que...", per les xerradetes tot prenent cafè i donuts (els adipòcits que vaig acumular durant aquella època es quedaran amb mi per sempre més), bé, ja ho saps, la llista és interminable... Et desitjo moltíssima sort en aquesta nova etapa que estàs a punt de començar, professor Altirriba! Maria, tu i jo vam començar el camí alhora i hem viscut un munt d'experiències juntes que ens han fet madurar i tornar-nos una mica més "heavies", gràcies sobretot per tots els teus "psicoexpress" i per saber valorar i tenir cura de la nostra amistat fins i tot en la distància. Marzo, has de saber que has estat per mi un exemple de decisió i lideratge, gràcies per totes les estones compartides prenent te o cafè i per les tardes de compres compulsives a les rebaixes. Amigó, sempre has estat l'ànima de la festa, des que vaig marxar del laboratori he trobat molt a faltar els teus crits escandalosos i evidentment les teves abraçades, gràcies per la teva simpatia i la teva espontaneïtat. Espero que l'amistat que ens ha unit a tots cinc perduri molt de temps i que ens puguem seguir trobant de tant en tant, per posar-nos al dia i fer el nostre ritual dels mojitos i les fondues de xocolata!*

*Sandra, Juli i Casetes, com ja va dir molt bé la Maria, heu estat una mica com les nostres “mamis”, gràcies per les xerradetes a les escales, els consells i tota l’ajuda i suport que m’heu donat sempre. Cases, gràcies també per fer-me tan bé de guia per Sevilla, sense tu i amb la meva orientació fatal encara avui seguiria perduda!*

*També voldria agrair a tots els investigadors seniors del laboratori, a l’Anna Novials, l’Eugènia, la Perla, la Belén, i en especial, a les “obeses”, la Mamen i la Sílvia Barceló, la bona predisposició que sempre han tingut per resoldre qualsevol dels meus dubtes i les aportacions que han fet a aquest projecte. A la Conxi, la Rosa i l’Helena, voldria agrair-los no només la seva ajuda “científica”, sinó també la personal.*

*A la Lúdia, la Yaiza i l’Ainhoa els agreixo la simpatia, l’amabilitat i el suport tècnic que m’han donat, en especial a l’Ainhoa, per la seva ajuda amb la laboriosa dieta de cafeteria.*

*A la Míriam i la Gemma, els desitjo molta sort per aconseguir una tesi d’èxit i “express”.*

*A les noies del Biobanc del Clínic, l’Anna, la “Baro” i la Roser, gràcies també per la vostra simpatia i les bones estones que vam passar a l’hora de dinar o fent cafès.*

*A la Sandra Rebuffat, la reina de la rebosteria, moltes gràcies pels teus deliciosos pastissos i, no cal dir-ho, per l’ajuda amb l’article.*

*Gràcies també a la Melina, per repartir tanta simpatia i fer aixecar l’ànim de tothom per allà on passa.*

*Al Nacho, que tot i que més d’una vegada em va fer enrabiard, sempre va estar disposat a donar-me un cop de mà, i a més, em va transmetre els seus valuosos trucs per elaborar una dieta de cafeteria irresistible!*

*Al Marc, per haver-me ajudat més d’una vegada a fer Southernns en aquell quartet radioactiu. (Encara ric ara quan penso com em vaig espantar quan em vas dir allò que la meva membrana pitava com Txernòbil!)*

*Al Felip, el de ses Illes, pel seu bon humor i per estar sempre disposat a apuntar-se a les reunions de “velles glòries”.*

*I bé, a tots i cadascun d’aquells amb qui he coincidit, encara que per poc temps, com la Laura, la Sílvia Moreno, l’Aida, la Felícia, .... perquè conèixer-vos ha estat enriquidor i, en definitiva, un plaer.*

*A fora del Laboratori de Diabetis i Obesitat també hi ha hagut molta gent que ha “sofert” la meva etapa predoctoral i a qui també vull donar les gràcies:*

*A la meva companya de pis, l'Estela, i a la de pis i laboratori, l'Esther, per fer que sempre fos agradable “tornar al piset” després de la feina.*

*A tots els del GIP, per tot el que m'heu ensenyat durant aquests dos últims anys i per anar dient-me allò de “Com portes la tesi?”, que sempre em feia posar les piles.*

*A la Núria i el Miquel, per l'amistat que continuem mantenint tot i la distància, per haver-me donat allotjament en els meus viatges a la capital i, en especial a la Núria, pel cop de mà amb el català, sento si t'he estressat una mica massa durant aquests últims mesos.*

*A l'Artur, per la seva amistat incondicional, per estar disposat a escoltar els meus “rotllos” a qualsevol hora i pels seus sempre valuosos consells sobre el món laboral.*

*Als de la colla del Morell, gràcies pels ànims que sempre m'heu donat i sento haver desaparegut del mapa durant aquest últim any de reclusió o si en alguna ocasió us he avorrit excessivament amb el monotema de la tesi, espero poder-ho compensar d'ara en endavant.*

*Gràcies també a tots el membres de la meva família, que m'heu ajudat a superar els moments difícils i m'heu donat suport i ànims per tirar endavant.*

*Al meu pare, gràcies per ensenyar-me que només hi ha una manera segura d'aconseguir les coses, amb treball, dedicació i passió per la feina, sento que no hi hagi pogut ser i espero que n'estiguis orgullós.*

*A la meva mare, moltes gràcies pel teu suport, la teva ajuda i el teu amor incondicional, sense els quals no ho hauria pogut fet. Ja pots estar contenta que per fi he acabat la “ditxosa” tesi!!!*



# ÍNDEX GENERAL



<b><u>ÍNDIX GENERAL</u></b>	XIII
<b><u>ÍNDIX DE TAULES I FIGURES</u></b>	XIX
<b><u>LLISTA D'ABREVIACIONS</u></b>	XXV
<b><u>I. INTRODUCCIÓ</u></b>	1
1. LA DIABETIS I L'OBESITAT	3
1.1. La diabetis mellitus	3
1.1.1. Classificació de les diabetis mellitus	4
1.1.2. Estadis clínics de la història natural de les diabetis mellitus	5
1.2. L'obesitat	6
1.3. La diabetis mellitus de tipus 2 associada a l'obesitat	8
1.3.1. Patogènesi de la diabetis mellitus de tipus 2	9
2. L'ILLOT PANCREÀTIC	12
2.1. Anatomia i histologia del pàncrees	12
2.1.1. Pàncrees exocrí: acinis i ductes	13
2.1.2. Pàncrees endocrí: illots de Langerhans	13
2.2. Regulació de la massa de cèl·lula beta	15
2.2.1. Evolució de la massa de cèl·lula beta al llarg de la vida	16
2.2.2. Canvis adaptatius de la massa de cèl·lula beta	18
2.2.3. Factors moduladors del creixement de la cèl·lula beta	19
2.2.4. Vies intracel·lulars implicades en el creixement de la cèl·lula beta	25
3. EL TEIXIT ADIPÓS	28
3.1. Característiques morfològiques i anatòmiques	28
3.2. Funcions del teixit adipós	30
3.3. Creixement del teixit adipós blanc	31
3.4. Funció emmagatzemadora del teixit adipós blanc	32
3.5. Funció endocrina del teixit adipós blanc	35
4. ELS FACTORS DE CREIXEMENT IGF1 I IGF2 I LES SEVES PROTEÏNES D'UNIÓ	42
4.1. Els factors de creixement IGF1 i IGF2	42
4.2. Les proteïnes d'unió als IGF	43
4.3. L'IGF1 i la IGFBP3 en el teixit adipós	45
<b><u>II. HIPÒTESI I OBJECTIUS</u></b>	47
<b><u>III. MATERIAL I MÈTODES</u></b>	51



1. OBTENCIÓ DEL MODEL EXPERIMENTAL	53
1.1. Justificació de l'elecció del model experimental	53
1.2. Animals, dietes i inducció a l'obesitat	53
2. PROTOCOL D'EXTRACCIÓ I OBTENCIÓ DE FLUIDS I TEIXITS	54
2.1. Obtenció de sang, plasma i sèrum	54
2.2. Obtenció de teixits	54
3. MESURES METABÒLIQUES I PROVA DE TOLERÀNCIA A GLUCOSA	55
4. IMMUNOHISTOQUÍMIQUES I ANÀLISIS MORFOMÈTRIQUES	56
4.1. Anàlisi morfològica del teixit adipós	56
4.2. Anàlisi morfològica del pàncrees	56
4.3. Mesura de la proliferació en illots	57
4.4. Fixació, inclusió en parafina i microseccionament de teixits	58
4.5. Tincions i immunohistoquímiques	59
4.6. Anàlisi d'imatges	61
5. CULTIUS CEL·LULARS	62
5.1. Procediments generals	62
5.2. Cultiu de cèl·lules INS1E	63
5.3. Aïllament i cultiu d'illots pancreàtics de rata	63
6. OBTENCIÓ DE MEDI CONDICIONAT DE TEIXIT ADIPÓS	65
7. ASSAIGS DE PROLIFERACIÓ	66
7.1. Estudi de la proliferació en cèl·lules INS1E	66
7.2. Estudi de la proliferació en illots	67
8. EXTRACCIÓ D'RNA I TRANSCRIPCIÓ REVERSA	68
8.1. Separació de les fraccions adipocitària i estromal del teixit adipós	68
8.2. Obtenció d'RNA de teixit adipós total o de les seves fraccions adipocitària i estromal	69
8.3. Transcripció reversa de l'RNA	71
8.4. Quantificació de la concentració i avaluació de la puresa de l'RNA i el cDNA	72
8.5. Comprovació de la qualitat de l'RNA	72
9. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER MICROARRAYS	73
9.1. Preparació i selecció de les mostres d'RNA	74
9.2. Amplificació, marcatge i hibridació de l'RNA	75
9.3. Processament i anàlisi estadística de les dades	77
9.4. Controls de qualitat	78
9.5. Selecció de gens que codifiquen per a proteïnes secretables i implicades en processos de proliferació	83
10. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER PCR QUANTITATIVA	84

11. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES	87
11.1. Homogeneïtzació dels teixits	87
11.2. Valoració de la concentració de les proteïnes	87
12. ESTUDI DE L'EXPRESSION PROTEICA PER WESTERN BLOT O LIGAND BLOT	88
12.1. Electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	88
12.2. Transferència humida	90
12.3. Transferència semiseca	91
12.4. Immunodetecció sobre membrana de PVDF	92
12.5. Detecció mitjançant un lligand sobre membrana de poliacrilamida	93
12.6. Reutilització de les membranes ( <i>stripping</i> )	94
13. ANÀLISI ESTADÍSTICA	94
<b>IV. RESULTATS</b>	95
1. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL D'OBESITAT	97
1.1. Efecte de la dieta de cafeteria sobre el pes corporal	97
1.2. Estudi gravimètric i morfològic del teixit adipós	98
1.3. Efecte de la dieta de cafeteria sobre paràmetres bioquímics	100
1.4. Estudi morfomètric del pàncrees	103
1.5. Estudi de la hiperplàsia i la hipertròfia de la cèl·lula beta	107
1.6. Contacte entre el teixit adipós i els illots	108
2. ESTUDI DE L'EFFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA	111
2.1. Efecte del medi condicionat de teixit adipós de diferents dipòsits sobre la proliferació de la línia de cèl·lula beta INS1E	111
2.2. Efecte del medi condicionat de teixit adipós pancreàtic mesentèric sobre la proliferació de les cèl·lules INS1E a diferents concentracions de glucosa	113
2.3. Efecte de la desactivació per calor del medi condicionat de teixit adipós pancreàtic mesentèric sobre la proliferació induïda en les cèl·lules INS1E	114
2.4. Proliferació induïda en illots per medi condicionat de teixit adipós pancreàtic mesentèric	115
3. CERCA DE GENS CANDIDATS RESPONSABLES DE L'EFFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA	116
3.1. Cerca de gens diferencialment expressats entre rates control i de cafeteria en teixit adipós pancreàtic mesentèric	117
3.2. Selecció de gens que codifiquen per a proteïnes secretables i implicades en processos de proliferació	120
3.3. Selecció de gens amb expressió gènica diferencial entre rates control i de cafeteria exclusiva de teixit adipós pancreàtic mesentèric	122

4. IMPLICACIÓ DE LA IGFBP3 EN L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA	125
4.1. Expressió gènica de la Igfbp3 i l'Igf1 en les fraccions estromal i adipocitària del teixit adipós	125
4.2. Expressió proteica de la Igfbp3 en teixit adipós	127
4.3. Secreció de la Igfbp3 i l'Igf1	129
4.4. Efecte de l'addició o el bloqueig de la Igfbp3 en la proliferació induïda pel medi condicionat pancreàtic mesentèric	133
<b><u>V. DISCUSSIÓ</u></b>	135
1. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL D'OBESITAT	137
2. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA	141
3. CERCA DE GENS CANDIDATS RESPONSABLES DE L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA	145
4. IMPLICACIÓ DE LA IGFBP3 EN L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA	152
<b><u>VI. CONCLUSIONS</u></b>	157
<b><u>VII. BIBLIOGRAFIA</u></b>	161
<b><u>VIII. ANNEX</u></b>	193
<b><u>IX. PUBLICACIONS ORIGINADES DURANT LA TESI</u></b>	201

# ÍNDIX DE TAULES I FIGURES



## **TAULES**

TAULA 1:	Estadis clínics de la diabetis mellitus	5
TAULA 2:	Criteris diagnòstics de la diabetis mellitus, la hiperglucèmia en dejú i la intolerància a glucosa	6
TAULA 3:	Composició de la dieta de cafeteria	54
TAULA 4:	Controls d'hibridació bioB, bioC, bioD i cre	81
TAULA 5:	Encebadors emprats en la PCR quantitativa	86
TAULA 6:	Dades obtingudes en l'anàlisi morfomètric del pàncrees i en l'estudi de la hipertròfia i la hiperplàsia de la cèl·lula beta	110
TAULA 7:	Passos seguits per a la cerca de gens candidats responsables de l'efecte del teixit adipós pancreàtic mesentèric sobre la proliferació de la cèl·lula beta	116
TAULA DE L'ANNEX:	Llista de gens diferencialment expressats en teixit adipós pMES entre rates control i de cafeteria, obtinguts en l'anàlisi dels microarrays	193

## **FIGURES**

FIGURA 1:	Anatomia del pàncrees humà	12
FIGURA 2:	Tipus cel·lulars i distribució d'un illot de múrids abans i després de la identificació de les cèl·lules èpsilon	14
FIGURA 3:	Mecanismes de plasticitat del pàncrees endocrí	16
FIGURA 4:	Evolució de la massa de cèl·lula beta al llarg de la vida	17
FIGURA 5:	Factors implicats en l'expansió de la massa de cèl·lula beta en resposta a la resistència a la insulina	25
FIGURA 6:	Vies de senyalització intracel·lulars de la insulina i els IGF	27
FIGURA 7 :	Morfologia del teixit adipós blanc i marró	29
FIGURA 8 :	Principals dipòsits de teixit adipós	30
FIGURA 9:	Efectes dels NEFA sobre els diferents teixits implicats en l'homeòstasi de la glucosa	33
FIGURA 10:	Efectes de l'emmagatzematge ectòpic de lípids	34
FIGURA 11 :	Efecte de les adipocitocines sobre l'homeòstasi de la glucosa	41
FIGURA 12:	Accions d'IGFBP3 en l'àmbit cel·lular	44
FIGURA 13:	Seccions de pàncrees tenyides per insulina i per Ki67	58
FIGURA 14:	Cromatogrames d'una mostra d'RNA total amb una integritat correcta o incorrecta	72

FIGURA 15:	Cromatogrames de les mostres d'RNA escollides per ser hibridades amb els microarrays.	74
FIGURA 16:	Procés d'hibridació d'una mostra d'RNA en un microarray d'Affymetrix	76
FIGURA 17:	Control d'OLIGOS B2	78
FIGURA 18:	Controls de qualitat de SimpleAffy	80
FIGURA 19:	Control d'observació dels valors crus	81
FIGURA 20:	Control d'integritat de l'RNA	82
FIGURA 21:	Control d'observació dels valors processats	83
FIGURA 22:	Gràfics d'amplificació i de dissociació d'una PCR quantitativa	86
FIGURA 23:	Evolució del pes corporal	97
FIGURA 24:	Valors gravimètrics de diferents teixits adiposos	99
FIGURA 25:	Morfometria del teixit adipós pMES	100
FIGURA 26:	Concentracions de diferents paràmetres bioquímics en estat basal	101
FIGURA 27:	Tests de tolerància a glucosa	102
FIGURA 28:	Percentatge d'àrea d'insulina en pàncrees i nombre d'illots per àrea de pàncrees	104
FIGURA 29:	Distribució segons la mida, en diagrames de caixes, dels illots mesurats en l'estudi morfomètric	105
FIGURA 30:	Distribució segons la mida, en diagrames de caixes, d'illots mesurats després del seu aïllament	106
FIGURA 31:	Mida de la cèl·lula beta i percentatge de cèl·lules en replicació de l'illot (nuclis Ki67+)	107
FIGURA 32:	Nombre d'illots inferiors a $500 \mu\text{m}^2$ per àrea de pàncrees	108
FIGURA 33:	Contacte entre el teixit adipós i els illots	109
FIGURA 34:	Proliferació induïda en cèl·lules INS1E per medis condicionats procedents de diferents dipòsits de teixit adipós	112
FIGURA 35:	Efecte de la concentració de glucosa en la proliferació induïda en cèl·lules INS1E pel medi condicionat pMES de rates de 30 dies de dieta	113
FIGURA 36:	Efecte de la desactivació per calor del medi condicionat pMES sobre la proliferació induïda en cèl·lules INS1E	114
FIGURA 37:	Proliferació induïda en illots per medi condicionat pMES procedent de rates de 30 dies de dieta	115
FIGURA 38:	Representació gràfica en dos components principals de les dades d'expressió obtingudes en cadascun dels 6 microarrays hibridats	117

FIGURA 39:	Gens relacionats amb metabolisme lipídic o teixit adipós amb canvis significatius obtinguts en l'anàlisi d'expressió gènica per microarrays	119
FIGURA 40:	Gens obtinguts a partir de l'anàlisi dels microarrays, amb expressió diferencial en teixit pMES entre rates control i de cafeteria, i que codifiquen per a proteïnes secretables	121
FIGURA 41:	Gens que codifiquen per a proteïnes secretables, implicats en processos de proliferació i amb canvis significatius obtinguts en l'anàlisi d'expressió gènica per microarrays	122
FIGURA 42:	Expressió gènica en teixit adipós obtinguda per PCR quantitativa	124
FIGURA 43:	Expressió gènica d'Igfbp3 i d'Igf1 en teixit adipós total o fraccionat	126
FIGURA 44:	Efecte de la dieta en l'expressió de la proteïna Igfbp3 en teixit adipós pMES i eWAT	127
FIGURA 45:	Diferent expressió de la proteïna Igfbp3 en teixit adipós pMES i eWAT segons la dieta administrada	128
FIGURA 46:	Valoració d'Igf1 i d'Igfbp3 en medi condicionat	130
FIGURA 47:	Valoració d'Igf1 i d'Igfbp3 en sèrum	132
FIGURA 48:	Efecte del bloqueig de Ialgbp3 en el medi condicionat pMES	133
FIGURA 49:	Efecte de l'addició de la Igfbp3 en el medi condicionat pMES	134





# LLISTA D'ABREVIACIONS



<b>Acrp30</b>	<i>Adipocyte complement-related 30 kDa protein (adiponectin)</i>
<b>Acs11</b>	<i>Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1</i>
<b>ADA</b>	Associació americana de diabetis
<b>ADIPOR1</b>	<i>Adiponectin receptor 1</i>
<b>ADIPOR2</b>	<i>Adiponectin receptor 2</i>
<b>AGRP</b>	<i>Agouti related protein</i>
<b>Akr1c18</b>	<i>Aldo-keto reductase family 1, member C18</i>
<b>Akt</b>	<i>Protein kinase B</i>
<b>Als</b>	<i>Acid-labile subunit</i>
<b>AMPc</b>	Monofosfat d'adenina cíclic
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i>
<b>apM1</b>	<i>Adipose most abundant gene transcript 1 protein (adiponectin)</i>
<b>APS</b>	Persulfat d'amoni
<b>ATP</b>	Trifosfat d'adenina
<b>Avpr1a</b>	<i>Arginine vasopressin receptor 1A</i>
<b>BAT</b>	Teixit adipós marró
<b>BMI</b>	Índex de massa corporal
<b>BSA</b>	Albúmina bovina sèrica
<b>CAF</b>	Cafeteria
<b>CART</b>	<i>Cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i>
<b>Ccnd1</b>	<i>Cyclin D1</i>
<b>cDNA</b>	Àcid desoxirribonucleic complementari
<b>Cgref1</b>	<i>Cell growth regulator with EF hand domain 1</i>
<b>Ch25h</b>	<i>Cholesterol 25-hydroxylase</i>
<b>Clu</b>	<i>Clusterin</i>
<b>cm</b>	Centímetre
<b>CREB</b>	<i>cAMP responsive element-binding protein</i>
<b>cRNA</b>	Àcid ribonucleic complementari
<b>CTRL</b>	Control
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfat
<b>dCTP</b>	Desoxicitosina trifosfat
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfat
<b>DM1</b>	Diabetis mellitus de tipus 1
<b>DM2</b>	Diabetis mellitus de tipus 2
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid
<b>DNA</b>	Àcid desoxirribonucleic
<b>DNAsa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>dNTP</b>	Deoxinucleòtid trifosfat

<b>DTT</b>	<i>Dithiothreitol</i>
<b>dTTP</b>	<i>Desoxitimidina trifosfat</i>
<b>dUTP</b>	<i>Desoxiuridina trifosfat</i>
<b>ECL</b>	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>Egf17</b>	<i>EGF-like domain 7</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>eWAT</b>	<i>Teixit adipós blanc epididimari</i>
<b>Fabp3</b>	<i>Fatty acid binding protein 3, muscle and heart</i>
<b>Fads3</b>	<i>Fatty acid desaturase 3</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal bovine serum</i>
<b>FC</b>	<i>Fold change</i>
<b>FDR</b>	<i>False discovery rate</i>
<b>Fgf18</b>	<i>Fibroblast growth factor 18</i>
<b>g</b>	<i>Gram</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i>
<b>GBP28</b>	<i>Gelatin-binding protein 28 (adiponectin)</i>
<b>Gdf10</b>	<i>Growth differentiation factor 10</i>
<b>GDP</b>	<i>Difosfat de guanosina</i>
<b>GH</b>	<i>Growth hormone</i>
<b>Ghbp</b>	<i>Growth hormone binding protein</i>
<b>Ghr</b>	<i>Growth hormone receptor</i>
<b>Ghrt</b>	<i>Growth hormone receptor truncated</i>
<b>GLP1</b>	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
<b>GLP1R</b>	<i>Glucagon-like peptide 1 receptor</i>
<b>GLUT4</b>	<i>Glucose transporter type 4</i>
<b>GRB2</b>	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>GTP</b>	<i>Trifosfat de guanosina</i>
<b>HBSS</b>	<i>Hanks' balanced salts solution</i>
<b>HEPES</b>	<i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N,-2-ethanesulphonic acid</i>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i>
<b>IDF</b>	<i>Federació internacional de diabetis</i>
<b>IFG</b>	<i>Hiperglucèmia en dejú</i>
<b>IGF</b>	<i>Insulin-like growth factor</i>
<b>IGF1</b>	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
<b>IGF1R</b>	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
<b>IGF2</b>	<i>Insulin-like growth factor 2</i>

<b>IGFBP</b>	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
<b>IGFBP3</b>	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>
<b>IGT</b>	Tolerància a glucosa alterada
<b>IGTT</b>	Test de tolerància a glucosa intraperitoneal
<b>IL6</b>	<i>Interleukin 6</i>
<b>IQR</b>	<i>Interquartile range</i>
<b>IR</b>	<i>Insulin receptor</i>
<b>IRS1</b>	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
<b>IRS2</b>	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
<b>iSUB</b>	Teixit adipós blanc subcutani inguinal
<b>JAK-2</b>	<i>Janus kinase 2</i>
<b>Kcal</b>	Quilocalories
<b>KDa</b>	Quilodàlton
<b>Kg</b>	Quilogram
<b>l</b>	Litre
<b>LB</b>	<i>Ligand Blot</i>
<b>LEP</b>	<i>Leptin</i>
<b>LPL</b>	<i>Lipoprotein lipase</i>
<b>Lrg1</b>	<i>Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1</i>
<b>LRP1</b>	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Mil·liamperi
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MAS5</b>	<i>Microarray suite 5</i>
<b>mg</b>	Mil·ligram
<b>ml</b>	Mil·lilitre
<b>mm</b>	Mil·límetre
<b>mM</b>	Mil·limolar
<b>MODY</b>	<i>Maturity-onset diabetes of the young</i>
<b>NAD</b>	Dinucleòtid de nicotinamida i adenina
<b>Nampt</b>	<i>Nicotinamide phosphoribosyltransferase (visfatin)</i>
<b>NCS</b>	<i>Newborn calf serum</i>
<b>NEFA</b>	Àcids grassos no esterificats
<b>nm</b>	Nanòmetre
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NPY</b>	<i>Neuropeptide Y</i>
<b>PAI-1</b>	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
<b>PBEF</b>	<i>Pre-B-cell colony-enhancing factor</i>

<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCA</b>	Anàlisi de components principals
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>PK1</b>	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
<b>Pemt</b>	<i>N-methyltransferase</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i>
<b>PL</b>	<i>Placental lactogen</i>
<b>pM</b>	Picomolar
<b>pMES</b>	Teixit adipós blanc mesentèric pancreàtic
<b>POMC</b>	<i>Proopiomelanocortin</i>
<b>PP</b>	<i>Pancreatic polipeptid</i>
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	<i>Proliferator-activated receptor gamma</i>
<b>PRL</b>	<i>Prolactin</i>
<b>PRLR</b>	<i>Prolactin receptor</i>
<b>PtdIns (3,4,5) P3</b>	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat
<b>PtdIns (4,5) P2</b>	Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfat
<b>Ptn</b>	<i>Pleiotrophin</i>
<b>RAR</b>	Receptor de l'àcid retinoic 11-trans
<b>RBP4</b>	<i>Retinol binding protein 4</i>
<b>RMA</b>	<i>Robust multi-chip average</i>
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Àcid ribonucleic missatger
<b>RNA<sub>s</sub></b>	Ribonucleasa
<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>RXR</b>	Receptor de l'àcid retinoic 9-cis
<b>SAM</b>	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
<b>Scarb1</b>	<i>Scavenger receptor class B, member 1</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfat de sodi
<b>SEM</b>	Error estàndard de la mitjana
<b>Sfrp4</b>	<i>Secreted frizzled-related protein 4</i>
<b>SNC</b>	Sistema nerviós central
<b>SNS</b>	Sistema nerviós simpàtic
<b>SOCS3</b>	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
<b>STAT5</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>Tbp</b>	<i>TATA-box binding protein</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>

<b>TEMED</b>	N, N, N, N'-tetra-metil-etilendiamina
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor, beta</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor, alpha</i>
<b>TNFR</b>	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
<b>TR</b>	<i>Transferrin</i>
<b>TZD</b>	Tiazolidindiones
<b>U</b>	Unitat
<b>UCP1</b>	<i>Uncoupling protein 1</i>
<b>V</b>	Volt
<b>W</b>	Watt
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>WHR</b>	Relació entre el perímetre de la cintura i del maluc
<b>ZDF</b>	Rata Zucker diabètica
<b><math>\mu</math>Ci</b>	Microcurie
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgram
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitre
<b><math>\mu</math>m</b>	Micròmetre
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar





# I. INTRODUCCIÓ



## 1. LA DIABETIS I L'OBESITAT

### 1.1. LA DIABETIS MELLITUS

La diabetis mellitus és una malaltia metabòlica que es caracteritza per la presència d'hiperglucèmia com a conseqüència de defectes en la secreció d'insulina i/o la seva acció.

En les últimes dècades, la diabetis mellitus s'ha estès de forma alarmant fins a convertir-se en un greu problema de salut mundial. Segons les estimacions de la Federació Internacional de Diabetis (IDF) el nombre de persones adultes afectades per la diabetis el 2007 fou de 246 milions, un 6% de la població adulta mundial. Es preveu que aquest nombre assolirà els 285 milions el 2010 i podria arribar a duplicar-se en els propers 20 anys si la tendència ascendent no es modifica (IDF, 2006; IDF, 2009)\*.

Els símptomes més característics de la diabetis mellitus són la polidípsia, la poliúria, la pèrdua de pes i, en algunes ocasions, la polifàgia i la visió borrosa. En els casos més severos, quan la hiperglucèmia és totalment incontrolada, també es pot presentar cetoacidosi o el síndrome hiperosmolar no cetònic, que sense un tractament adequat condueixen a la mort del pacient.

La hiperglucèmia crònica afecta nombrosos sistemes i òrgans, de manera que les complicacions a llarg termini de la diabetis són molt diverses. Algunes d'elles són la retinopatia, amb potencial pèrdua de la vista; la nefropatia, amb possibilitat de fallada renal; i la neuropatia perifèrica, de la qual se'n poden derivar úlceres i, en últim terme amputacions de les extremitats. Els pacients amb diabetis també presenten una elevada incidència d'arteriosclerosi i malaltia cardiovascular. Aquestes complicacions causen una gran morbiditat i generen importants despeses sanitàries a nivell mundial; les calculades per a l'any 2007 foren de 232 bilions de dòlars americans. Així mateix, el cost en vides associat a la diabetis és cada vegada més elevat i es preveu que en el 2010 quasi 4 milions de morts adultes seran atribuïbles a la diabetis, la qual cosa representa un 6,8% de la mortalitat total de la població adulta (IDF, 2006; IDF, 2009)\*.

Aquestes dades, doncs, fan palesa la magnitud del problema sanitari que suposa la diabetis i la gran necessitat existent de cercar els millors mètodes per prevenir-la i/o tractar-la.

\*Les dades mostrades foren calculades per la població adulta (20-79 anys), ja que la major part de les persones que pateixen diabetis pertanyen a aquest grup d'edat, i en les 7 regions que componen la IDF.

### 1.1.1. Classificació de les diabetis mellitus

La classificació actualment vigent (ADA, 2008) dels diferents tipus de diabetis inclou quatre categories:

Diabetis mellitus de tipus 1 (DM1): és causada per una destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques, sovint d'origen autoimmune, que dona lloc a un dèficit total d'insulina. Els pacients afectats requereixen l'administració exògena d'insulina per poder sobreviure i és per aquest motiu que en el passat, la DM1 va rebre el nom de "diabetis insulino-dependent". També s'anomenà "diabetis juvenil", ja que la seva aparició es dona més aviat en la infantesa o la joventut. Actualment aquesta nomenclatura ha estat abandonada perquè aquestes característiques són compartides també per altres tipus de diabetis.

Diabetis mellitus de tipus 2 (DM2): és el tipus més comú de diabetis i en representa entre el 90% i el 95% dels casos. En aquesta forma de diabetis, la hiperglucèmia apareix per la combinació d'una acció deficient de la insulina en els teixits perifèrics (múscul, fetge i teixit adipós) i una secreció d'insulina insuficient.

Els pacients amb diabetis tipus 2 poden mantenir el control de la glucèmia per mitjà d'intervencions en el seu estil de vida (dieta i exercici) o bé per l'administració d'hipoglucèmians orals. Anteriorment, la DM2 era coneguda com a "diabetis no insulino-dependent" o "diabetis de l'adult". Aquesta nomenclatura també fou substituïda per l'actual, ja que la DM2 no és totalment independent d'insulina (en els estadis més avançats de la malaltia pot requerir-se l'administració d'insulina per mantenir el control de la glucèmia), i a més, tot i que és més comuna en persones adultes, actualment també es dona en infants i adolescents.

Tipus específics de diabetis: el defecte que les causa està perfectament definit o tenen trets molt característics que permeten la seva distinció. Aquesta categoria engloba les formes de diabetis causades per defectes monogènics en la funció de la cèl·lula beta, les quals s'anomenen MODY (*maturity-onset diabetes of the young*), o per defectes genètics en l'acció de la insulina, en les quals es troba afectat el receptor de la insulina o les molècules que formen part de la seva via de senyalització. També en formen part certs tipus de diabetis que són induïts per fàrmacs o tòxics, o que la seva aparició és secundària a altres malalties, com ara algunes malalties del pàncrees exocrí, endocrinopaties (acromegàlia, síndrome de Cushing, hipertiroïdisme, etc.), infeccions (rubeòla, coxsackievirus B, cytomegalovirus, adenovirus, etc.) o síndromes genètics (síndrome de Down, de Klinefelter, de Turner, ataxia de Friedreich, etc.)

Diabetis gestacional: es defineix com qualsevol hiperglucèmia o grau d'intolerància a glucosa que apareix o es detecta en el període gestacional.

### 1.1.2. Estadis clínics de la història natural de les diabetis mellitus

Una vegada ha aparegut la hiperglucèmia, i també durant el procés patològic que precedeix aquest fet, es poden definir un seguit d'estadis clínics (vegeu la taula 1) que descriuen el desenvolupament i la progressió natural de la diabetis (ADA, 2008):

1. Inicialment, la regulació de la glucèmia és correcta i no es pot detectar cap anormalitat, ni tant sols en un test de tolerància a glucosa. No obstant això, en el pacient coincideixen certs factors genètics, immunitaris o ambientals que el predisposen a partir la malaltia.

2. Aquest estadi el segueix un període de duració variable en el qual la regulació de la glucèmia es troba alterada. Aquesta desregulació inicial de la glucèmia pot manifestar-se a través d'una hiperglucèmia en dejú (*impaired fasting glucose* o IFG) o per una tolerància a glucosa alterada (*impaired glucose tolerance* o IGT). La IFG i la IGT representen diferents anomalies de la regulació de la glucèmia, tot i que poden donar-se al mateix temps. Els individus que es troben en aquest estadi tenen un risc elevat de progressar cap a diabetis. La IGT pot detectar-se només mitjançant un test oral de tolerància a glucosa, mentre que la IFG es dona quan les concentracions de glucosa en dejú són inferiors a aquelles que indiquen un diagnòstic de diabetis, però superiors a les que presenten els individus sans amb tolerància normal a la glucosa (vegeu la taula 2).

3. Després de l'aparició de la hiperglucèmia (període diabètic), la glucèmia pot ser controlada en alguns pacients mitjançant canvis en l'estil de vida com ara fer dieta o esport. En canvi, en d'altres seran necessaris la insulina o els agents hipoglucemians orals per controlar la glucèmia o per prevenir la cetosi o la cetoacidosi. Quan es requereix la insulina per prevenir la cetosi, aquesta resulta imprescindible per sobreviure.

TAULA 1: Estadis clínics de la diabetis mellitus (ADA, 2008).

Estadis	Normoglucèmia	Hiperglucèmia			
	Tolerància normal a la glucosa	Regulació de la glucèmia alterada	Diabetis mellitus		
			NO insulino-dependent	Insulino-dependent per controlar la glucèmia	Insulino-dependent per sobreviure
Tipus					
DM1	←				→
DM2	←		→		→
Diabetis específiques	←		→		→
Diabetis gestacional	←		→		→

**TAULA 2:** Criteris diagnòstics de la diabetis mellitus, la hiperglucèmia en dejú i la intolerància a glucosa (ADA, 2008).

Diagnòstic	Criteris que s'han d'acomplir
<b>Diabetis mellitus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presència de símptomes de diabetis (poliúria, polidípsia i pèrdua de pes sense una causa justificada) juntament amb una determinació de glucèmia en qualsevol moment del dia superior o igual a 200 mg/dl (11,1 mmol/l).</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucèmia superior o igual a 126 mg/dl (7,0 mmol/l) després de romandre en dejú com a mínim 8 hores.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucèmia superior o igual a 200 mg/dl (11,1 mmol/dl) 2 hores després de l'administració per via oral d'una dosi de 75 g de glucosa anhidra dissolta en una gran quantitat d'aigua (test oral de tolerància a glucosa).</li> </ul>
<b>Hiperglucèmia en dejú (IFG)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucèmia entre 100 i 125 mg/dl (5,6- 6,9 mmol/l) després de romandre en dejú com a mínim 8 hores.</li> </ul>
<b>Intolerància a la glucosa (IGT)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucèmia entre 140 i 199 mg/dl (7,8-11,1 mmol/l) 2 hores després de l'administració per via oral d'una dosi de 75 g de glucosa anhidra dissolta en una gran quantitat d'aigua (test oral de tolerància a glucosa).</li> </ul>

## 1.2. L'OBESITAT

L'obesitat es defineix com l'estat d'acumulació anormal o excessiva de teixit adipós que compromet la salut de l'individu.

L'indicador més emprat en la pràctica clínica per definir el grau d'obesitat és el **BMI (*body mass index*)** o **índex de massa corporal**, el qual es defineix com la relació del pes entre l'alçada al quadrat (Gallagher *et al.*, 2000):

$$\text{BMI} = \text{pes (Kg)} / \text{alçada}^2 \text{ (m}^2\text{)}$$

La classificació del diferents graus de pes d'acord amb el BMI és la següent:

Pes insuficient: BMI < 18,5

Normopès: BMI entre 18,5-25.

Sobrepès: BMI entre 25-30.

Obesitat: BMI entre 30-35

Obesitat mòrbida: BMI > 35

El BMI permet obtenir una mesura aproximada de l'adipositat acumulada en tot l'organisme. No obstant això, la distribució de l'adipositat generalment no és uniforme i més aviat augmenta més en unes determinades regions del cos que en d'altres. Un

paràmetre emprat per estimar la distribució regional del greix és la **WHR (*waist to hip ratio*)** o **relació entre el perímetre de la cintura i del maluc** (Janssen *et al.*, 2002), d'acord amb el qual, podem distingir dos tipus d'obesitat (Lafontan i Berlan, 2003):

Obesitat superior (*upper-body obesity*): se sol anomenar "obesitat central", "abdominal" o "visceral", ja que es caracteritza per una major acumulació de greix en la zona abdominal, concretament en els dipòsits de tipus subcutani i visceral. També rep el nom d' "obesitat andrògena", ja que es presenta sobretot en els homes.

Obesitat inferior (*lower-body obesity*): es caracteritza per l'acumulació del greix especialment localitzat en les parts inferiors de cos, sobretot del teixit adipós subcutani femoral i glútia. També s'anomena "obesitat ginoide", ja que és més habitual en les dones.

L'anàlisi de la distribució del greix corporal mitjançant la mesura de la relació entre la cintura i el maluc té una gran importància clínica, ja que permet establir l'existència d'obesitat central (quan és superior a 1 en homes, i a 0,85 en dones) (Han *et al.*, 1997). Aquest tipus d'obesitat mostra una major associació amb certes complicacions derivades de l'obesitat, incloent'hi la diabetis de tipus 2 (Despres i Lemieux, 2006; Montague i O'Rahilly, 2000). Per aquest motiu, actualment es considera que la WHR és millor que el BMI com a indicador del risc que comporta l'obesitat.

L'obesitat es desenvolupa quan l'entrada d'energia en l'organisme és superior a la seva despesa energètica i, en conseqüència, s'origina un balanç energètic positiu que és emmagatzemat en forma de greix. L'entrada d'energia ve determinada per la ingesta d'aliments, la qual no només depèn de la possibilitat d'accedir-hi, sinó també dels senyals cerebrals que la indueixen o la inhibeixen. La despesa energètica és el resultat de la suma de l'activitat física, del metabolisme basal i de la termogènesi adaptativa. Per activitat física entenem tots els moviments voluntaris, per metabolisme basal, tots els processos necessaris per sustentar la vida en estat de repòs, i per termogènesi adaptativa, el conjunt de processos que dissipen energia en forma de calor en resposta als canvis de l'entorn.

Segons dades de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), el 2005 aproximadament 1,6 bilions d'adults (de més de 15 anys) presentaven sobrepès i 400 milions d'adults eren obesos. Les previsions per al futur són de 2,3 bilions el 2015 amb sobrepès i 700 amb obesitat. L'obesitat i el sobrepès actualment no només afecten els països més desenvolupats, sinó que s'extenen ràpidament pels països en vies de desenvolupament, on paradoxalment coexisteixen amb la fam i la desnutrició.

L'obesitat i el sobrepès donen lloc a importants problemes de salut. Les complicacions derivades de l'obesitat amb una major repercussió per a la salut són les malalties cardiovasculars, que causen una gran mortalitat, la diabetis mellitus, les



complicacions respiratòries (apnea obstructiva), les alteracions musculars i òssies (osteoartritis) i certs tipus de càncers (endometrial, de pit i de còlon).

En l'etiologia de l'obesitat hi intervenen tant factors genètics com ambientals. Determinar la contribució relativa de cadascun d'ells ha estat motiu d'una intensa recerca científica. Actualment, malgrat que es reconeix la importància de la predisposició genètica, existeix un ampli consens a l'hora de considerar els factors ambientals i de comportament els principals responsables de l'epidèmia d'obesitat (Hill i Peters, 1998). L'expansió de l'obesitat s'atribueix a certs canvis en l'estil de vida que s'han donat en les societats més industrialitzades com ara:

- l'adopció de patrons dietètics caracteritzats per la ingesta d'aliments altament calòrics.
- l'adquisició d'uns hàbits de vida sedentaris a causa d'un menor requeriment d'esforç físic, tant a la feina com a la llar, que ha comportat la industrialització.

Segons alguns autors, l'obesitat podria considerar-se una manifestació de la discordança existent entre els canvis ambientals esdevinguts en les societats actuals i el llegat genètic que hem heretat dels nostres primers antecessors (Neel, 1962). Aquesta hipòtesi, coneguda com "dels gens estalviadors", postula que en el passat, la manca d'aliments durant llargs períodes de temps hauria afavorit la supervivència dels individus amb una major capacitat d'emmagatzemar eficientment l'energia en forma de greix. A causa d'aquesta selecció, hauríem heretat uns gens estalviadors que, a diferència dels nostres antecessors, a nosaltres no ens conferirien un major avantatge genètic sinó que ens resultarien totalment inadequats per adaptar-nos a l'ambient d'abundància alimentària i sedentarisme de les societats actuals.

### **1.3. LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 2 ASSOCIADA A L'OBESITAT**

La DM2 constitueix d'un 85 a un 95% dels casos de diabetis en els països desenvolupats i afecta un percentatge fins i tot més alt als països en vies de desenvolupament (IDF, 2009). Així doncs, una immensa part de l'epidèmia de diabetis que actualment ens afecta és de tipus 2.

En la patogènesi de la DM2 hi intervenen tant factors genètics com ambientals. Malgrat aquest caràcter multifactorial, la rapidesa amb què la DM2 s'ha estès en les últimes dècades respon sobretot a les modificacions en l'estil de vida que s'han donat en les societats actuals. Els factors ambientals que han afavorit l'epidèmia d'obesitat, com el consum d'aliments altament calòrics i la disminució de l'activitat física, han estat també determinants en el cas de la DM2.

L'evolució paral·lela de les epidèmies d'obesitat i de DM2 no ha estat casual, sinó que s'explica perquè aquestes són dues patologies estretament lligades. Sovint les dues coexisteixen en un mateix pacient, de manera que entre un 60% i un 90% dels diabètics de tipus 2 són obesos (Zimmet *et al.*, 2001). L'obesitat representa el factor de risc més important per desenvolupar DM2, sobretot a causa de la seva associació amb la resistència a insulina. La condició d'obès multiplica el risc de patir diabetis per 10 en les dones, i per 11,2 en els homes (Field *et al.*, 2001). Aquest risc és encara més alt quan l'obesitat és de tipus central, és a dir, quan el greix es concentra en el tronc i les àrees abdominals (Chan *et al.*, 1994). La gran interdependència existent entre ambdues fins i tot ha portat alguns autors a adoptar el terme anglès *diabesity* per referir-se a l'encavalcament d'aquestes dues patologies (Zimmet *et al.*, 2001).

### 1.3.1. Patogènesi de la diabetis mellitus de tipus 2

La DM2 és el resultat de la combinació de dues anomalies en un mateix pacient:

- una acció debilitada de la insulina (resistència a insulina), que origina una major demanda d'insulina per tal de poder mantenir els efectes d'aquesta en els seus teixits diana.
- una disfunció en la cèl·lula beta que no permet respondre correctament a la major necessitat d'insulina i per tant, fa impossible mantenir la normoglicèmia.

#### Resistència a insulina

La importància de la resistència a insulina en la patogènesi de la DM2 és un fet àmpliament acceptat. Es tracta d'una anomalia que es pot detectar en la immensa majoria de diabètics de tipus 2 (Haffner *et al.*, 1997) i nombrosos estudis prospectius han demostrat que és present des dels estadis més inicials de la malaltia (Lillioja *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1992).

El terme "resistència a insulina" es defineix com la baixa resposta dels teixits diana de la insulina als seus efectes metabòlics. Les conseqüències que se'n deriven són diferents segons el teixit afectat. Una de les principals accions de la insulina és estimular la captació i la utilització de la glucosa en tot l'organisme, però preferentment en el múscul esquelètic. Així, la resistència a insulina en el múscul redueix significativament la utilització de la glucosa circulant. La producció hepàtica de glucosa està fortament inhibida per la insulina. La falta de sensibilitat a insulina en el fetge indueix un augment de la producció de glucosa que, al seu torn, contribueix a agreujar la hiperglicèmia característica de l'estat diabètic. El principal efecte de la insulina en el teixit adipós és la

inhibició de la lipòlisi. Per tant, la menor sensibilitat a insulina en aquest teixit incrementa l'alliberació d'àcids grassos lliures a la circulació, els efectes dels quals són empitjorar encara més la resistència a insulina en els altres teixits, atès l'ambient lipotòxic que s'hi origina (Gerich, 2003).

La resistència a insulina és un defecte estretament lligat a l'obesitat i, de fet, és la manera més important en què aquesta última contribueix a l'aparició de la diabetis. No només l'obesitat inespecífica, és a dir, l'elevat índex de massa corporal, sinó també la distribució específica de la massa adiposa en la regió abdominal, és també un factor determinant per a la sensibilitat a insulina (Despres i Lemieux, 2006).

El teixit adipós desenvolupa un paper clau en el manteniment de l'homeòstasi energètica de l'organisme. L'obesitat i les complicacions que se'n deriven, com la mateixa resistència a insulina, són una manifestació de la impossibilitat del teixit adipós per acomplir correctament el seu paper de "regulador energètic". Aquest paper el desenvolupa tant gràcies a la seva funció d'òrgan secretor com a la seva condició de magatzem lipídic. Per tant, podríem afirmar que en el cas de l'obesitat, la diabetis de tipus 2 que se'n deriva és, de fet, el resultat de la disfunció de dos teixits: del teixit adipós, que té com a principal resultat la resistència a insulina, i de la cèl·lula beta, que afecta la secreció d'insulina.

### Disfunció de la cèl·lula beta

Malgrat el seu paper destacat, la resistència a insulina no és suficient per desencadenar la hiperglucèmia. La millor prova d'aquest fet és que una gran part dels individus obesos no arriben a desenvolupar DM2 (Mokdad *et al.*, 2001), i que tampoc no presenten hiperglucèmia diversos models animals amb una severa obesitat o resistència a insulina (Nandi *et al.*, 2004). S'ha pogut comprovar que, en aquests casos, per evitar la diabetis, és decisiva la capacitat de la cèl·lula beta per adaptar la secreció d'insulina al grau de sensibilitat a aquesta. Aquest procés d'adaptació es coneix com a "resposta compensatòria de la cèl·lula beta" i és el resultat de la suma d'aquests dos processos:

- l'increment de la secreció d'insulina en cada cèl·lula beta.
- l'augment de la massa de cèl·lula beta.

El paper clau d'aquesta resposta, ha generat un gran interès per definir els mecanismes moleculars que la fan possible. Pel que fa a l'increment de secreció d'insulina, s'ha proposat que pot tenir lloc gràcies a l'estimulació per certs factors circulants o pel sistema nerviós parasimpàtic, i a través d'un augment del metabolisme de la glucosa o una major expressió d'insulina (Prentki i Nolan, 2006). En el cas de la compensació mitjançada per l'augment de la massa de cèl·lula beta, també s'ha suggerit

l'existència de certs factors circulants que la podrien induir. Les aportacions científiques al respecte han estat nombroses tot i que no ha estat constatada la implicació de cap factor en concret (vegeu el capítol 2.2.3).

En estudis longitudinals de pacients diabètics s'observa que durant l'estat prediabètic té lloc un increment de la insulinèmia, fet que demostra l'intent de compensació per part de la cèl·lula beta. Aquesta hiperinsulinèmia aconsegueix mantenir la normogluccèmia durant un cert temps, però el deteriorament progressiu de la cèl·lula beta condueix a l'aparició d'intolerància a glucosa en primer lloc, i de diabetis en últim terme (Lillioja *et al.*, 1988; Lillioja *et al.*, 1993).

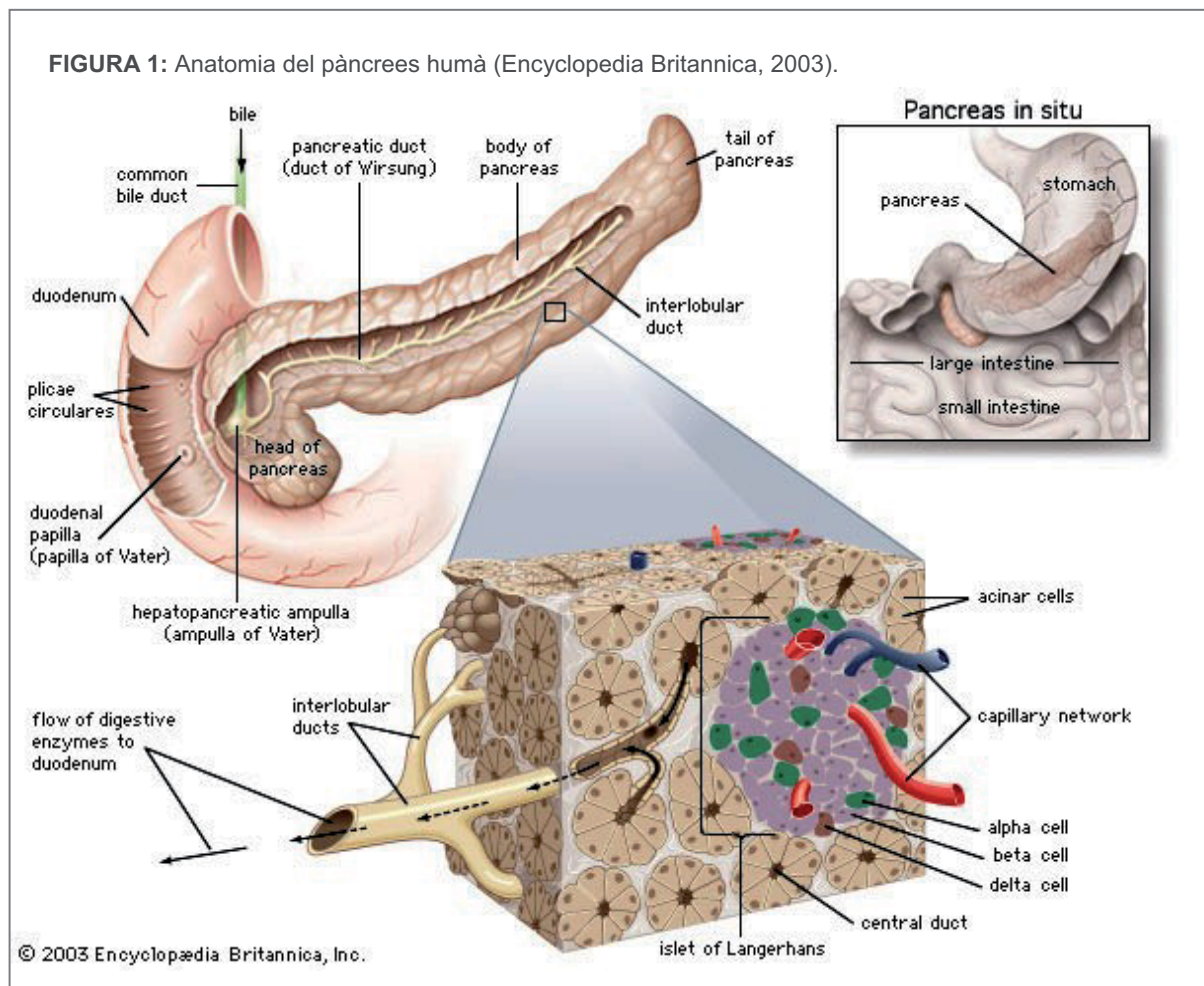
La manca d'una resposta compensatòria eficient per part de la cèl·lula beta és causada per anomalies que poden afectar la secreció d'insulina o bé impedir el creixement adequat de la massa de cèl·lula beta. Pel que fa a l'origen d'aquestes anomalies, l'opinió més generalitzada és que moltes d'elles són heretades i actuen com a factor predisposant per al desenvolupament de la DM2. La coincidència entre aquesta predisposició genètica i la resistència a insulina adquirida a causa de l'obesitat, faria que la cèl·lula beta acabés fallant, en veure's forçada a secretar insulina per sobre de les seves capacitats. A mesura que la malaltia avança, també contribueixen al deteriorament de la secreció d'insulina altres anomalies adquirides, provocades tant per la mateixa hipergluccèmia creixent (glucotoxicitat) com per l'ambient lipotòxic derivat de l'obesitat (Leahy, 2005).

## 2. L'ILLOT PANCREÀTIC

### 2.1. ANATOMIA I HISTOLOGIA DEL PÀNCREES

El pàncrees és una glàndula que es troba adjacent a la curvatura de l'estómac. El seu nom deriva del grec *Pan creas*, que significa "teixit a través", ja que, sobretot en múrids, sembla que penetri en la membrana de l'intestí. Anatòmicament se sol dividir en tres regions: el cap, el qual es troba adjacent al duodè, el cos, que és la part central situada sota la curvatura de l'estómac, i finalment la cua, més pròxima a la melsa (vegeu la figura 1). El pàncrees té dues funcions fisiològiques que són:

- La producció i secreció exocrina d'enzims digestius que són alliberats al duodè a través del colèdoc per les cèl·lules acinars del pàncrees.
- La producció i secreció d'hormones endocrines que són alliberades a la circulació pels illots pancreàtics.



### 2.1.1. Pàncrees exocrí: acins i ductes

El pàncrees exocrí, que forma la major part de la glàndula, està format per les cèl·lules acinars, de forma piramidal i amb el nucli en posició basal, les quals es troben agrupades formant els acins. Al citoplasma de les cèl·lules acinars hi destaca la presència de grànuls secretors que contenen enzims digestius (proteases, amilases, lipases i nucleases, entre d'altres), la majoria dels quals són secretats en forma de precursors que s'activen en entrar al duodè.

La llum dels acins, on s'alliberen les secrecions de les cèl·lules exocrines, desemboca a uns conductes anomenats ductes pancreàtics, els quals aboquen el seu contingut al duodè a través del colèdoc (vegeu la figura 1). Les petites cèl·lules centroacinars que es troben en la unió acin-ducte tenen forma cuboïdal. Els ductes estan formats per cèl·lules epitelials columnars, tot i que en els ductes més grans també existeix un petit nombre de cèl·lules caliciformes semblants a les existents a l'intestí.

### 2.1.2. Pàncrees endocrí: illots de Langerhans

El pàncrees endocrí té un paper primordial en el metabolisme, secretant diferents hormones a la vena pancreàtica-duodenal que drena a la vena porta, i constitueix un òrgan de vital importància en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa.

Les cèl·lules endocrines s'organitzen en agrupacions microscòpiques anomenades illots pancreàtics. Aquests van ser identificats per primera vegada per Paul Langerhans el 1869, raó per la qual 24 anys més tard van rebre el nom d'illots de Langerhans. El significat funcional d'aquests illots no es va reconèixer fins al 1889, quan von Mering i Minkowski descobriren que la manca del pàncrees provocava hiperglucèmia.

Els illots es distribueixen aleatòriament pel teixit exocrí, tot i que se n'observa una major densitat en la cua del pàncrees. En mamífers adults representen entre un 1 i un 2% de la massa pancreàtica total.

Més d'un 90% de les cèl·lules endocrines formen part dels illots, però sobretot en humans, també es detecta una petita proporció de cèl·lules individuals o que formen part de petits clústers situats entre el teixit exocrí o adjacents als ductes pancreàtics (Bouwens i Pipeleers, 1998). La forma dels illots també canvia entre humans i múrids; en aquests últims adopten una forma més aviat esfèrica, mentre que en els primers són menys regulars.

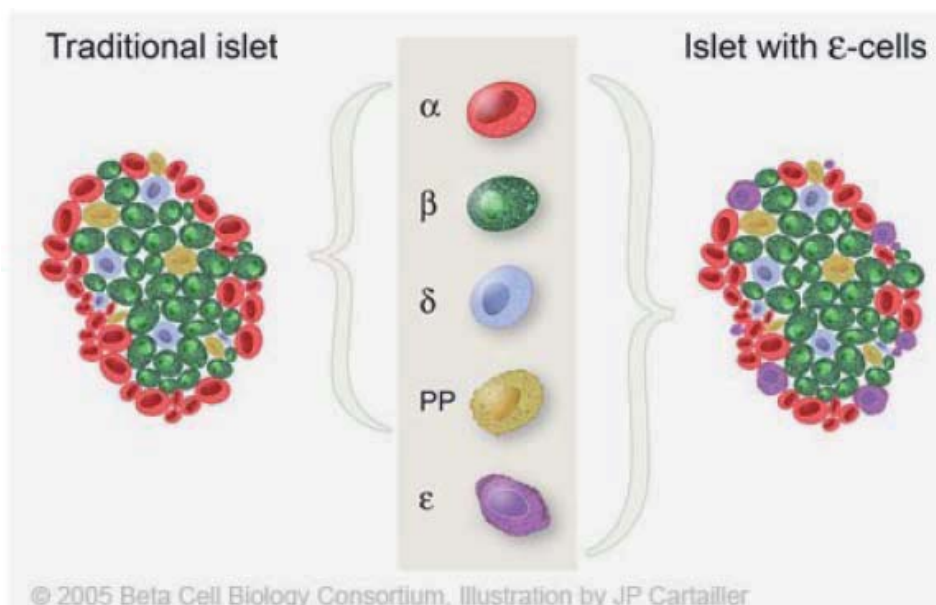
Existeixen quatre tipus principals de cèl·lules endocrines. Les cèl·lules beta, que secreten insulina i en menor grau amilina, conformen la major part de l'illot, entre un 70 i un 80% del total cel·lular. Els altres tipus són les cèl·lules alfa, secretores de glucagó, les

## Introducció

cèl·lules delta, secretores de somatostatina, i les cèl·lules PP, que secreten polipèptid pancreàtic. Més recentment també ha estat descrita l'existència d'una cinquena població cel·lular anomenada èpsilon, productora de ghrelina, en els illots de ratolins adults i sobretot en l'etapa embrionària (Prado *et al.*, 2004; Wierup *et al.*, 2004) (vegeu la figura 2). La insulina i el glucagó són les dues hormones principals en el control del balanç entre l'emmagatzematge i el consum de la glucosa. La insulina és secretada en resposta als nutrients, mentre que la secreció de glucagó es troba inhibida. En dejú, el glucagó és secretat per incrementar principalment la producció hepàtica de glucosa.

En la major part del pàncrees les cèl·lules més abundants de l'illot són les beta, seguides de les alfa i les delta. En la cua del pàncrees, però, aquestes proporcions canvien ja que els illots estan conformats en la seva major part per cèl·lules PP. Aquesta diferent distribució cel·lular al llarg del pàncrees sembla tenir la seva explicació en la diferent ontogènia dels primordis pancreàtics (Orci *et al.*, 1976). Existeix una localització precisa i ordenada dels diferents tipus cel·lulars a dins de l'illot: les cèl·lules beta estan disposades a la part central i les denominades genèricament no beta (cèl·lules alfa, delta i PP) es troben a la perifèria formant un mantell d'1 a 3 cèl·lules de gruix (Orci i Unger, 1975) (vegeu la figura 2). Aquesta distribució és sobretot característica dels múrids, en canvi, en humans, aquesta arquitectura cel·lular és menys clara i quan s'observen seccions centrals dels illots també s'hi detecten cèl·lules no beta.

**FIGURA 2:** Tipus cel·lulars i distribució d'un illot de múrids abans i després de la identificació de les cèl·lules èpsilon (Beta Cell Biology Consortium).



## 2.2. REGULACIÓ DE LA MASSA DE CÈL·LULA BETA

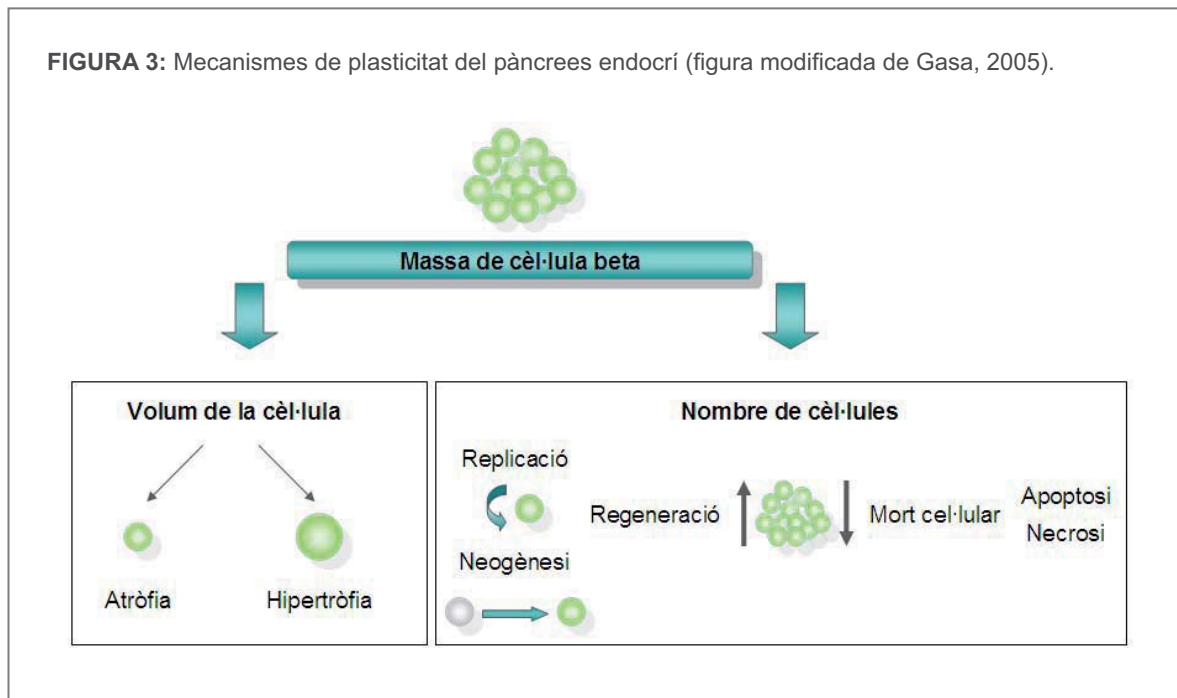
La massa de cèl·lula beta, al contrari del que s'havia postulat durant molt de temps, és dinàmica i mostra una gran plasticitat per tal d'adaptar-se a les variacions en la demanda d'insulina i assegurar un òptim control de la glucèmia.

Els mecanismes d'aquesta plasticitat del pàncrees endocrí inclouen canvis, d'una banda, en el volum de les cèl·lules beta (hipertròfia o atròfia), i per l'altra, en el nombre absolut d'aquestes (hiperplàsia o hipoplàsia). A la vegada, aquest nombre de cèl·lules beta ve determinat per un delicat balanç entre processos de regeneració (neogènesi i replicació) i de mort cel·lular (apoptosi i necrosi) (vegeu la figura 3). Les característiques d'aquests processos són:

- Hipertròfia o atròfia: augment o disminució de la mida de cada cèl·lula beta individual.
- Neogènesi: formació de noves cèl·lules beta a partir de cèl·lules precursors. Aquestes cèl·lules precursors s'ha proposat que poden ser tant cèl·lules pluripotencials com cèl·lules ductals que, en determinades circumstàncies, podrien desdiferenciar-se i després ser reprogramades cap a cèl·lules beta (Bouwens, 1998).
- Replicació: divisió de cèl·lules beta preexistents per mitosi. Del total de cèl·lules beta només una fracció limitada entren en mitosi; per tant, la regulació de la replicació es fa variant aquesta fracció de cèl·lules i no mitjançant la durada del cicle cel·lular, que es manté constant (14,9 hores) (Swenne, 1982).
- Apoptosi: mort programada de la cèl·lula. Es tracta d'un procés ràpid i controlat. En finalitzar, les restes cel·lulars són fagocitades per macròfags. S'evita així l'alliberament de continguts intracel·lulars i la resposta inflamatòria que se'n podria derivar.
- Necrosi: mort accidental de la cèl·lula a causa d'un dany sever i sobtat.

Aquests processos són essencials, en primer lloc, a l'hora d'establir una correcta massa de cèl·lula beta durant el creixement fetal, després del desenvolupament embrionari. Posteriorment, en l'adult, també permeten adequar la població de cèl·lula beta tant al creixement normal que es dona al llarg de la vida, com a determinades condicions fisiològiques o patològiques que impliquen canvis importants en la demanda d'insulina.





### 2.2.1. Evolució de la massa de cèl·lula beta al llarg de la vida

Durant el creixement fetal es dona la major expansió de la població de cèl·lules beta. En rates, des del dia embrionari 16, es produeix diàriament una duplicació del total de cèl·lules beta (McEvoy i Madson, 1980). Aproximadament un 10% d'aquest creixement s'obté per la replicació de cèl·lules beta preexistents (Swenne i Eriksson, 1982), mentre que el 90% restant s'atribueix a processos de neogènesi a partir de precursors indiferenciats, els quals es troben al voltant dels illots en formació i expressen marcadors ductals (citoqueratines) (Bouwens i Kloppel, 1996). La massa de cèl·lula beta que establerta durant l'etapa fetal és crítica i quan no es l'adequada, per exemple a causa de malnutrició fetal o retard en el creixement intrauterí, la replicació postnatal no és suficient per compensar aquesta deficiència i en l'edat adulta augmenta la predisposició a patir intolerància a glucosa i diabetis (Breant *et al.*, 2006).

En el període postnatal la massa de cèl·lula beta segueix creixent, tot i que a un ritme més baix que en el fetus (Kaung, 1994; McEvoy, 1981; McEvoy i Madson, 1980). En aquest cas els mecanismes implicats són també la replicació i la neogènesi a partir de precursors que envolten els illots (Bouwens *et al.*, 1994). Concretament després del deslletament, també s'observa un augment transitori de l'apoptosi, tant en múrids (Scaglia *et al.*, 1997) com en humans (Kassem *et al.*, 2000), que pel que sembla va associat a una remodelació de l'illot o a canvis en la maduració de la cèl·lula beta.

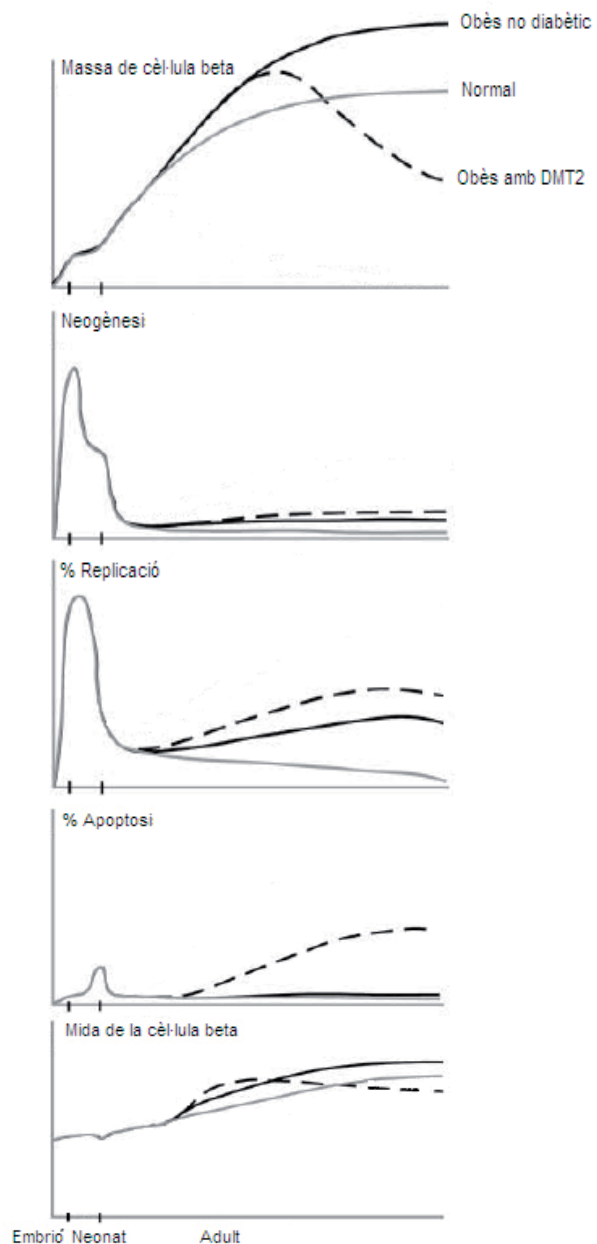
Una vegada en l'edat adulta, la població de cèl·lula beta es continua expandint a un ritme que, tot i que és més lent que en les etapes anteriors, permet que aquesta es vagi adaptant perfectament a l'augment del pes corporal. De fet, ha estat descrita l'existència d'una correlació lineal entre la massa de cèl·lula beta i la massa corporal (Montanya *et al.*, 2000). En rates mascles joves la població de cèl·lules beta creix d'un 2 a un 3% per dia i aquest índex decau a mesura que avança l'edat (Finegood *et al.*, 1995). En humans s'ha observat que se segueix el mateix patró, de manera que l'índex de replicació de la cèl·lula beta és també màxim en la infància (Meier *et al.*, 2008).

L'augment de la massa de cèl·lula beta en l'adult es dona majoritàriament per un increment de la mida dels illots preexistents més que per la formació de nous illots (Skau *et al.*, 2001) i la hipertròfia de les cèl·lules beta és un dels mecanismes principals que hi participen, sobretot en edats avançades (Montanya *et al.*, 2000).

Pel que fa a la implicació de la replicació i la neogènesi, malgrat que ha estat un tema molt controvertit, diversos estudis han evidenciat que el mecanisme més comú mitjançant el qual s'incrementa la massa de cèl·lula beta en l'adult és la replicació (Dor *et al.*, 2004; Georgia i Bhushan, 2004; Teta *et al.*, 2007). Les evidències experimentals que existeixen de la neogènesi es basen en observacions histològiques de cèl·lules que coexpressen insulina (marcador de cèl·lula beta) i citoqueratina (marcador de ducte) o la

**FIGURA 4:**

Evolució de la massa de cèl·lula beta al llarg de la vida (Ackermann i Gannon, 2007).



presència de petites agrupacions de cèl·lules beta pròximes als ductes pancreàtics. Aquestes evidències s'han obtingut sobretot mitjançant intervencions quirúrgiques importants, com lligacions de ducte o pancreatectomies, amb les quals s'aconsegueix induir un important procés de regeneració pancreàtica (Bonner-Weir *et al.*, 1993; Bouwens i Rooman, 2005; Finegood *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1995). En dos treballs dels que hem mencionat anteriorment (Georgia i Bhushan, 2004; Teta *et al.*, 2007), s'intentà demostrar l'existència de neogènesi després d'una pancreatectomia, mitjançant la tècnica del llinatge genètic, però es comprovà que el mecanisme predominant, fins i tot en un procés de regeneració com aquest, continuava sent la replicació. L'absència de neogènesi en aquests casos fou justificada afirmant que les pancreatectomies que es realitzaren, del 50% i el 70%, no eren suficients per provocar una regeneració tan important com la que es dona amb la del 90%. En aquest sentit, recentment s'ha publicat un altre estudi de llinatge genètic en el qual sí que s'aconsegueix demostrar l'existència de precursors de cèl·lula beta en el pàncrees adult. Aquests precursors se situen en els ductes i es diferencien cap a cèl·lula beta, expressant transitòriament el marcador endocrí específic Ngn3, en sotmetre el pàncrees a una lligació parcial de ducte (Xu *et al.*, 2008).

En conclusió, podríem afirmar que la replicació sembla ser el mecanisme més important mitjançant el qual s'expandeix la massa de cèl·lula beta, però, dependent de les circumstàncies, la intervenció de la neogènesi també és possible. També cal tenir en compte que la majoria d'estudis que han permès arribar a aquesta conclusió han estat realitzats en múrids. Per tant, no es pot descartar que la neogènesi tingui un paper més important en altres espècies. Diversos estudis demostren que existeixen diferències importants entre en el pàncrees humà i el dels múrids. Per exemple, en humans, un 15% de les cèl·lules beta no es troben en els illots sinó en petites agrupacions distribuïdes pel teixit exocrí, les quals són molt escasses en el pàncrees dels múrids (Bouwens i Pipeleers, 1998). També s'ha demostrat que la capacitat replicativa de les cèl·lules beta és inferior en humans que en múrids (Meier *et al.*, 2008; Tyrberg *et al.*, 2001).

### **2.2.2. Canvis adaptatius de la massa de cèl·lula beta**

A més de mantenir la massa de cèl·lula beta en circumstàncies normals, l'organisme també és capaç d'adaptar-la a diferents situacions fisiològiques o patològiques en les quals els requeriments d'insulina són majors.

Una situació fisiològica d'augment de la massa de cèl·lules beta causada per una resposta adaptativa puntual és l'embaràs, durant el qual, la demanda d'insulina s'incrementa per l'augment de pes corporal i de la resistència a insulina de la mare. Al final de la gestació en rates, la massa beta augmenta fins a 2,5 vegades gràcies a un

increment de la proliferació (Parsons *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 1992; Van Assche *et al.*, 1980). Durant els 10 dies posteriors al part, la massa de cèl·lules beta es redueix fins a tornar als valors normals que tenia abans de l'embaràs mitjançant atrofia, un increment de l'apoptosi i una disminució de la proliferació (Scaglia *et al.*, 1995). La manca d'aquesta hiperplàsia compensatòria que es dona durant l'embaràs pot provocar l'aparició de diabetis gestacional, la qual afecta entre un 1-2% de les dones embarassades.

Un exemple de situació patològica en la qual la massa de cèl·lula beta experimenta un augment compensatori és l'obesitat, en què la resistència a insulina provoca una major demanda d'insulina. Com ja s'ha indicat anteriorment, aquesta resposta compensatòria és essencial per evitar l'aparició de la hiperglucèmia. Una prova d'aquest fet és que la massa de cèl·lula beta dels diabètics de tipus 2 es troba reduïda un 50% respecte a la d'individus sans amb el mateix pes (Butler *et al.*, 2003) i de fet, només un terç dels individus obesos desenvolupen DM2; la resta de casos poden evitar-la mantenint una massa de la cèl·lula beta adequada (Kloppel *et al.*, 1985; Mokdad *et al.*, 2001).

Aquesta plasticitat de la cèl·lula beta que permet l'adaptació a l'obesitat, així com la seva implicació en la DM2, també s'ha comprovat en diversos models d'animals amb obesitat i resistència a insulina induïdes tant per dieta com per modificacions genètiques. Per exemple, els models de ratolí *ob/ob* i de rata Zucker *fa/fa*, els quals presenten una mutació en el gen de la leptina i en el del seu receptor respectivament, desenvolupen obesitat i resistència a insulina sense arribar a manifestar diabetis gràcies al fet que experimenten una gran expansió de la massa de cèl·lula beta. En canvi, dos altres models amb idèntiques mutacions però amb diferent rerafons genètic, el ratolí *db/db* i la rata Zucker diabètica (ZDF), tot i mostrar també un increment inicial de la massa de cèl·lula beta, acaben desenvolupant diabetis a causa d'una pèrdua de massa per apoptosi (Pick *et al.*, 1998).

### **2.2.3. Factors moduladors del creixement de la cèl·lula beta**

Han estat descrits nombrosos nutrients i factors de creixement que poden augmentar la massa o la replicació de la cèl·lula beta (Bouwens i Rooman, 2005; Vasavada *et al.*, 2006). A continuació s'esmenten els que tenen un paper més rellevant en l'adaptació de la massa de cèl·lula beta a l'obesitat o l'embaràs.

### Paper dels lactògens

La família dels lactògens inclou tres pèptids amb una elevada homologia entre ells: l'hormona del creixement (GH), la prolactina (PRL) i el lactogen placentari (PL). Les dues primeres són secretades per la glàndula pituitària i, en canvi, el lactogen placentari és produït i secretat per la placenta durant la gestació.

Aquests factors han estat relacionats amb l'increment de la massa de cèl·lula beta que es dona durant l'embaràs. Existeixen certes evidències experimentals que atribueixen al PL un paper més destacat que a la resta de lactògens en aquest procés com ara que les seves concentracions en sèrum augmenten en l'embaràs coincidint amb una major proliferació de la cèl·lula beta (Parsons *et al.*, 1992), que pot induir la proliferació de la cèl·lula beta *in vitro*, en cultius d'illots humans i de múrids, i el seu efecte és més potent que el de la GH o la PRL (Brelje *et al.*, 1993), i que quan se sobreexpressa en cèl·lula beta, es duplica la massa i la proliferació d'aquesta (Vasavada *et al.*, 2000).

El paper fisiològic dels lactògens en el control de la massa de cèl·lula beta també es veu recolzat pel fet que els seus receptors, GHR (de la GH) i PRLR (de la PRL i el PL), tenen una major expressió en cèl·lula beta durant l'embaràs (Moldrup *et al.*, 1993) i, a més, els *knockouts* d'aquests receptors mostren una reducció en la massa de cèl·lula beta (Freemark *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). Els dos receptors pertanyen a la família de receptors de citocines, els quals actuen a través de la via de senyalització de JAK/STAT. Concretament, la unió dels lactògens als seus receptors provoca l'activació de JAK-2 i a continuació la translocació de STAT5 al nucli, on activa l'expressió de diferents gens, entre ells el de la ciclina D2 (Friedrichsen *et al.*, 2001).

### Paper del GLP1

El GLP1 (*glucagon-like peptide 1*) és una hormona alliberada pel tracte gastrointestinal en resposta a la ingesta. S'obté a partir del processament postraduccional del proglucagó i és secretat per les cèl·lules enteroendocrines L de l'intestí. Tot i que fou descobert per les seves accions directes en la secreció d'insulina, posteriorment s'ha comprovat que també pot expandir la massa de cèl·lula beta estimulant-ne la proliferació, supervivència i diferenciació. Arran d'aquestes funcions tan diverses ha estat motiu d'una intensa investigació pel seu potencial ús terapèutic en la DM2.

Diversos estudis *in vitro* han demostrat els efectes del GLP1 sobre la proliferació, tant en illots de múrids com en línies cel·lulars beta. Aquests efectes no són dependents de glucosa, a diferència dels que el GLP1 exerceix sobre la secreció d'insulina (Buteau *et al.*, 2001). El GLP1 també protegeix la cèl·lula beta contra l'apoptosi causada, per exemple, per la lipoglutotoxicitat (Buteau *et al.*, 2004). Finalment, també s'ha descrit

l'efectivitat d'aquesta hormona en la transdiferenciació de línies cel·lulars acinars (AR42J) o ductals (Capan1 i ARIP) cap a un fenotip de cèl·lula beta (Hui *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 1999).

La capacitat del GLP1 d'incrementar la massa de cèl·lula beta *in vivo* s'ha comprovat emprant models molt diversos. Els mecanismes pels quals s'aconsegueix aquest efecte varien entre uns models i els altres. La neogènesi seria el mecanisme emprat pel GLP1 sobretot en la regeneració després d'agressions importants com una pancreatectomia (Xu *et al.*, 1999) o la destrucció de la població cel·lular beta per STZ (estreptozotocina, un agent citotòxic per a la cèl·lula beta) (Tourel *et al.*, 2001). En canvi, en el model de rata ZDF, el GLP1 augmenta la massa de cèl·lula beta inhibint l'apoptosi i induint-ne la proliferació (Farilla *et al.*, 2002).

Per tal d'investigar el paper fisiològic del GLP1, també ha estat examinat el fenotip del *knockout* del seu receptor (GLP1R). En condicions normals, aquest no presenta canvis en la seva massa de cèl·lula beta (Ling *et al.*, 2001; Scrocchi *et al.*, 1996) i només quan és sotmès a una pancreatectomia, s'observa una reducció en la regeneració posterior (De Leon *et al.*, 2003). Per altra banda, quan s'anul·la el receptor del GLP1 en un model d'obesitat com és el ratolí *ob/ob*, l'expansió compensatòria de la massa de cèl·lula beta no queda afectada (Scrocchi *et al.*, 2000), fet que indica que el paper del GLP1 no és rellevant en aquest cas o que altres factors poden suplir la seva acció.

La senyalització postreceptor de GLP1 és dóna a través de la via AMPc-PKA. Un dels factors que activa aquesta via és CREB, el qual indueix l'expressió de l'IRS2 (Jhala *et al.*, 2003) (vegeu l'apartat 2.2.4 i les figures 5 i 6). També ha estat descrit que per certs efectes del GLP1 és necessària la transactivació del receptor de l'EGF (Buteau *et al.*, 2003).

### Paper de la glucosa

La glucosa és un dels estímuls més potents pel creixement de la cèl·lula beta (Bernard-Kargar i Ktorza, 2001). *In vitro*, tant la proliferació de cèl·lules beta de múrids (Schuppín *et al.*, 1993) com la d'illots humans (Tyrberg *et al.*, 1996) incrementa amb concentracions creixents de glucosa. També se n'han demostrat els efectes *in vivo*: la infusió de glucosa durant 48 hores en rates provoca tant la hipertròfia com la hiperplàsia de la cèl·lula beta (Bonner-Weir *et al.*, 1989).

És interessant destacar que l'acció de molts factors de creixement, pels quals també s'ha descrit un efecte sobre la proliferació de la cèl·lula beta (IGF1 o GH), és dependent de glucosa (Cousin *et al.*, 1999; Hugl *et al.*, 1998). L'opinió d'alguns autors és que la glucosa actuaria com una plataforma que permetria l'acció d'altres factors

(Rhodes, 2000), tot i que un treball publicat més recentment indica que el paper que té la glucosa podria ser més aviat predominant (Terauchi *et al.*, 2007). En aquest estudi es comprova que l'haploinsuficiència per glucocinasa (enzim regulador clau del metabolisme de la glucosa en la cèl·lula beta) impedeix la resposta compensatòria a la resistència a insulina induïda per una dieta rica en greixos. Es proposa un possible mecanisme d'acció de la glucosa en el qual el metabolisme d'aquesta incrementaria la concentració de calci intracel·lular i donaria lloc a la fosforilació de CREB i a una major expressió d'IRS2 (vegeu l'apartat 2.2.4 i les figures 5 i 6). No obstant això, queda per resoldre la qüestió de com pot provocar la glucèmia l'augment de massa de cèl·lula beta en individus obesos que es mantenen normoglicèmics: alguns autors argumenten que petits canvis transitoris en la glucèmia podrien ser suficients per induir aquest procés o que el grau d'activitat i/o d'expressió de la glucocinasa també podria servir com a senyal per activar la proliferació de la cèl·lula beta (Weir i Bonner-Weir, 2007).

Aquests efectes de la glucosa sobre la proliferació de la cèl·lula beta també s'han atribuït a la insulina, la qual podria actuar de forma autocrina sobre la mateixa cèl·lula beta, una vegada secretada per l'estímul de la glucosa. Tanmateix, aquesta hipòtesi no es veu recolzada pel fet que la inducció de la proliferació per la glucosa es manté tot i inhibint la secreció d'insulina mitjançant somatostatina (Lingohr *et al.*, 2006).

Cal també destacar que, contràriament a aquests efectes beneficiosos, la hiperglucèmia prolongada provoca efectes negatius en l'illot, procés conegut com a glucotoxicitat. En aquest sentit s'ha descrit que el deteriorament de la funcionalitat de l'illot provocat per un estat d'hiperglucèmia crònic va acompanyat d'una disminució en la massa cel·lular beta a causa d'un increment de l'apoptosi (Koyama *et al.*, 1998).

### Paper de la insulina i els IGF

La insulina, l'IGF1 i l'IGF2 pertanyen a una mateixa família de pèptids, els *insulin-like growth factors*. Els tres pèptids presenten una gran homologia entre ells. La insulina només és sintetitzada per les cèl·lules beta del pàncrees; en canvi els IGF, tot i que tenen com a principal òrgan productor el fetge, també són secretats per molts teixits, on actuen de forma paracrina o autocrina. Entre els teixits productors d'IGF es troba el pàncrees (Hill *et al.*, 1999; Hogg *et al.*, 1994). En aquest, durant el període fetal i neonatal es detecta una major expressió d'IGF2, en canvi, l'IGF1 és expressat preferentment a partir de l'etapa postnatal.

Tant la insulina com els IGF s'han estudiat extensament com a possibles mediadors de l'expansió de la massa de cèl·lula beta per les seves propietats antiapoptòtiques i mitòtiques, sobretot després de la constatació que una de les vies que

activen, la d'IRS2-PI3K-AKT (vegeu l'apartat 2.2.4), és clau per a aquest procés.

Pel que fa als IGF, diversos experiments *in vitro*, tant en illots de rata i humans com en línies cel·lulars, han demostrat que promouen la supervivència i la mitogènesi de la cèl·lula beta (Hogg *et al.*, 1993; Sieradzki *et al.*, 1988). L'IGF1 és més potent que l'IGF2 en la inducció d'aquest efecte i a més, actua sinèrgicament amb la glucosa en el rang fisiològic de concentracions de glucosa (Dickson *et al.*, 2001; Hugl *et al.*, 1998; Lingohr *et al.*, 2002).

Aquest possible paper dels IGF s'ha vist reforçat per estudis realitzats en animals genèticament modificats. La sobreexpressió d'IGF2 en cèl·lula beta dóna lloc a un increment important en la mida dels illots (Petrik *et al.*, 1999), i en el cas de l'IGF1, confereix protecció contra la destrucció de la cèl·lula beta induïda per STZ, mitjançant una millora de la supervivència i la regeneració del pàncrees endocrí (George *et al.*, 2002). En canvi, els resultats obtinguts amb el *knockout* d'IGF1 en pàncrees resulten contradictoris ja que aquest no mostra una disminució, com caldria esperar, sinó un increment en la massa de cèl·lula beta que els autors atribueixen a l'acció compensatòria d'altres factors (Lu *et al.*, 2004).

Per altra banda, l'efecte de la senyalització d'insulina sobre la massa de cèl·lula beta no està clar, sobretot pel fet que *in vivo*, la insulina es troba estretament lligada a la glucosa i sovint l'efecte d'una d'elles pot ser degut a l'altra. En certs estudis amb models hiperglucèmics es descriu un efecte positiu de la insulina, per exemple, l'administració d'aquesta promou la proliferació d'illots fetals trasplantats a rates diabètiques (Brown *et al.*, 1981; McEvoy i Hegre, 1979), així com la regeneració de la massa de cèl·lula beta en rates nSTZ (en les que se'ls administra STZ en el període neonatal) (Movassat *et al.*, 1997). En canvi, quan s'administra insulina o es trasplanten insulinomes a animals normoglucèmics es produeix una reducció de la massa de cèl·lula beta (Blume *et al.*, 1995; Koiter *et al.*, 1995), fet que també pot ser atribuït a la hipoglucèmia que provoquen aquests tractaments. En un treball en el que sí que s'aconsegueix dissociar l'efecte de la glucosa del de la insulina (Paris *et al.*, 2003), s'observa que ambdues provoquen un augment de la massa de cèl·lula beta tot i que varien els mecanismes que hi estan implicats. El *knockout* d'insulina afegeix encara més confusió a aquest tema en donar suport a una acció negativa de la insulina sobre la proliferació de la cèl·lula beta: tot i que el ratolí mor poc després del naixement, l'anàlisi morfològica del seu pàncrees mostra un increment en la proliferació i l'àrea dels illots (Duvillie *et al.*, 2002).

Els efectes de la insulina i els IGF són mitjançats per la unió específica als seus receptors. Els responsables de les seves accions són el receptor de la insulina (IR) i el d'IGF1 (IGF1R), al qual també s'uneix l'IGF2. L'elevada homologia que comparteixen tant



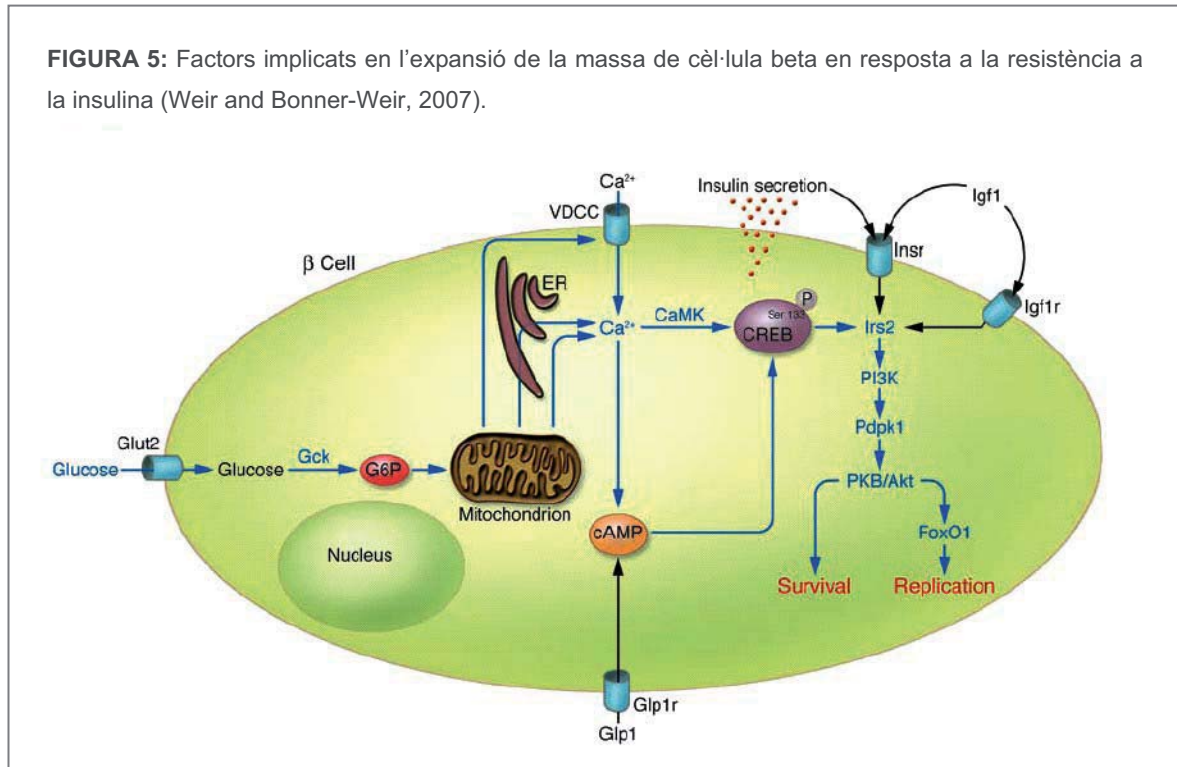
els 2 receptors com els seus 3 lligands fa que sigui possible la unió creuada entre ells, tot i que en aquest cas l'afinitat és menor (Werner *et al.*, 2008).

Diversos estudis s'han centrat en determinar quin d'aquests dos receptors, IR o IGF1R, és més crític pel manteniment i expansió de la massa de cèl·lula beta. Segons l'antiga concepció, el receptor d'insulina era el que mitjançava els efectes metabòlics, i el receptor d'IGF1, els relacionats amb processos de proliferació o diferenciació. Això no obstant, en els últims anys diversos treballs amb els seus *knockouts* han permès evidenciar que el receptor d'insulina tindria un paper més rellevant que el d'IGF1 en el creixement de la cèl·lula beta. El *knockout* del receptor d'insulina específic de cèl·lula beta mostra illots de mida menor (Kulkarni *et al.*, 1999), mentre que en el de l'IGF1 no s'observen canvis en la massa de cèl·lula beta (Kulkarni *et al.*, 2002; Xuan *et al.*, 2002). També s'han estudiat aquests models sotmetent-los a resistència a insulina i/o a l'obesitat i s'ha comprovat que només la manca del receptor d'insulina impedeix l'expansió de massa de cèl·lula beta que es dona en aquestes condicions (Okada *et al.*, 2007).

Malgrat que aquests resultats fan evident que el receptor d'insulina és més crític pel manteniment i expansió de la massa de cèl·lula beta, cal destacar que algunes observacions també suggereixen un cert grau de compensació entre els dos receptors per tal de dur terme aquesta funció. Per exemple, quan s'eliminen els dos receptors alhora en la cèl·lula beta, s'obté un fenotip més greu que el del *knockout* simple del receptor d'insulina, amb una reducció de la massa de cèl·lula beta més pronunciada (Ueki *et al.*, 2006). Recentment s'han publicat dos treballs més en els quals també s'insinua aquesta compensació. En un d'ells s'observa que en cèl·lules beta sense el receptor d'insulina, derivades del *knockout* pel receptor d'insulina, l'expressió del receptor d'IGF1 incrementa i, a més, l'activació de la via IRS2-PI3K-AKT per part d'IGF1 és major (Assmann *et al.*, 2009). En l'altre estudi treballen amb un *knockout* induïble del receptor d'insulina específic de fetge, un model que desenvolupa hiperplàsia de la cèl·lula beta en resposta a la resistència a insulina induïda en el fetge (Escribano *et al.*, 2009). Els autors observen que tant l'expressió en fetge com la concentració plasmàtica d'IGF1 augmenten quan s'indueix la resistència a insulina hepàtica. També mostren que l'IGF1 és capaç de promoure una major proliferació en els illots pancreàtics dels animals *knockout* que en els dels controls. Aquesta última observació l'atribueixen a l'activació creuada per part d'IGF1 del receptor d'insulina, concretament de la isoforma A, la qual es troba sobreexpressada en els illots dels *knockouts*.

En general, tota aquesta informació resulta força confusa però també deixa entreveure que el creixement de la cèl·lula beta no depèn d'un únic factor. En el cas de l'expansió de la massa de cèl·lula beta en resposta a l'obesitat, la glucosa, la insulina i els IGF semblen ser els principals implicats. La glucosa, perquè és necessària la seva

metabolització, i la insulina i els IGF, perquè mantenen activada la via de senyalització IRS2-PI3K-AKT (Assmann *et al.*, 2009; Gleason *et al.*, 2007; Terauchi *et al.*, 2007) (vegeu la figura 5).



#### 2.2.4. Vies intracel·lulars implicades en el creixement de la cèl·lula beta

Existeixen múltiples vies intracel·lulars implicades en el creixement de la cèl·lula beta (Heit *et al.*, 2006; Vasavada *et al.*, 2006). Malgrat que a cadascuna d'aquestes se li ha atribuït la propagació del senyal d'uns determinats factors, també és cert que existeixen certes connexions entre elles. En particular, la via de l'IRS2-PI3K-AKT, activada per la insulina i els IGF, s'ha comprovat que pot mitjançar els efectes de diferents factors i té un paper molt important en l'adaptació de la cèl·lula beta a la resistència a insulina (vegeu les figures 5 i 6).

La insulina i els IGF s'uneixen als seus receptors i provoquen la seva autofosforilació i activació. Aquests, al seu torn, inicien la propagació del senyal fosforilant als seus substractes, l'IRS1 i l'IRS2. Només un d'ells, l'IRS2, s'ha vist que és crític per al creixement i la supervivència de la cèl·lula beta. L'evidència d'aquest fet s'ha obtingut en comparar els fenotips dels dos *knockouts* de l'IRS1 i l'IRS2. Tots dos tenen un grau de resistència a insulina similar, però així com el ratolí *Irs1<sup>-/-</sup>* manté la normoglicèmia gràcies

a una resposta compensatòria d'expansió de la massa de cèl·lula beta (Araki *et al.*, 1994; Tamemoto *et al.*, 1994), el ratolí deficient per IRS2 desenvolupa diabetis a causa de la manca d'aquesta resposta (Kubota *et al.*, 2000).

L'activació d'IRS2 inicia dues vies principals de senyalització en la cèl·lula beta: la de PI3K-AKT i la de p42/p44 MAPK. La primera és la que està més implicada en el manteniment i expansió de la massa de cèl·lula beta, tal com han constatat els diversos treballs que s'han anat succeint a partir de la troballa de l'IRS2. Per exemple, en el *knockout* específic de cèl·lula beta d'una cinasa d'aquesta via, la PDK1, s'observa una reducció de la massa de cèl·lula beta (Hashimoto *et al.*, 2006). En particular, un substracte de la PDK1, la cinasa AKT, és un punt on convergeixen els efectes de diferents factors i té múltiples dianes relacionades amb els processos de neogènesi, replicació, supervivència i atròfia o hipertròfia cel·lular (Dickson i Rhodes, 2004; Elghazi *et al.*, 2006) (vegeu la figura 5). En aquest sentit s'ha descrit que l'expressió en cèl·lula beta d'una proteïna AKT constitutivament activa augmenta la massa de cèl·lula beta fins a 10 vegades, proporcionant protecció contra la diabetis induïda per STZ (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2001; Tuttle *et al.*, 2001). També s'ha observat que en rates Zucker, model que presenta una important expansió de la massa de cèl·lula beta, es detecta una major fosforilació d'AKT en cèl·lules associades a ductes i també en els illots (Jetton *et al.*, 2005), fet que reforça encara més el paper clau de l'AKT en la resposta d'expansió de la massa de cèl·lula beta a la resistència a insulina.

**FIGURA 6: Vies de senyalització intracel·lulars de la insulina i els IGF.**

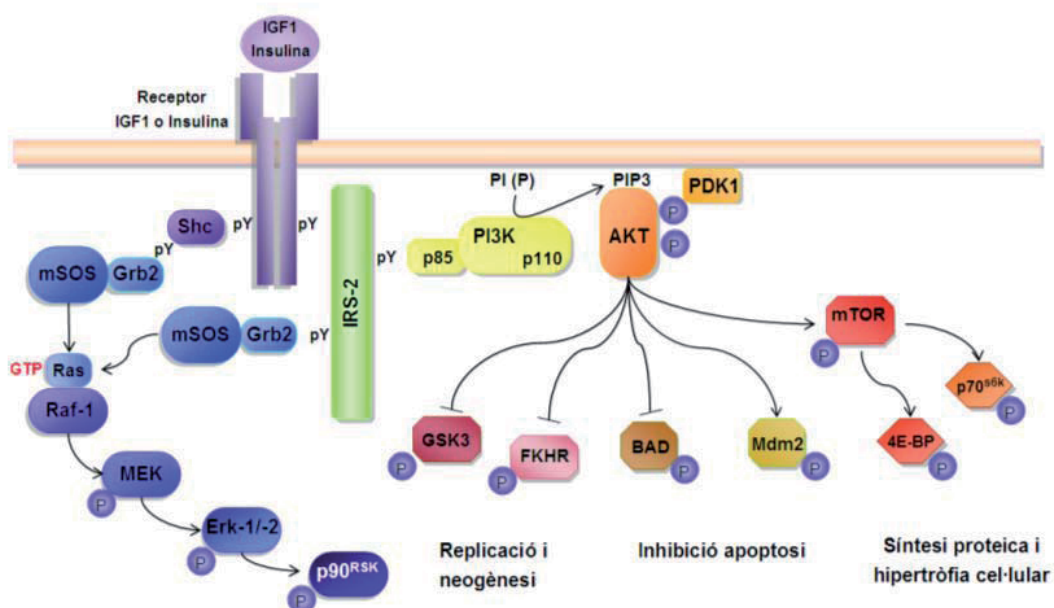
Les dues vies principals de senyalització de la insulina i els IGF són la de PI3K-AKT i la de p42/p44 MAP cinasa. Un cop els lligands s'uneixen al seu receptor, aquest s'activa i fosforila en residus tirosina els IRS, els quals són substrats comuns de les dues vies. A partir d'aquí el senyal es va propagant per mitjà de diverses fosforilacions i activacions de cinases.

#### Via PI3K - AKT

L'activació dels IRS provoca el reclutament de la subunitat reguladora de la PI3K, anomenada p85, que s'uneix a les tirosines fosforilades dels IRS per mitjà dels seus dominis SH2. Això comporta l'activació de la subunitat catalítica de la PI3K, la p110, que fosforila els PtdIns (4,5) P<sub>2</sub> de la membrana plasmàtica obtenint PtdIns (3,4,5) P<sub>3</sub>. Els PtdIns (3,4,5) P<sub>3</sub> serveixen com a punt d'ancoratge per a l'AKT a la membrana plasmàtica, on pot ser fosforilada i activada per una altra cinasa, la PDK1. Una vegada activada, l'AKT es desenganxa de la membrana i pot fosforilar i activar diverses dianes intracel·lulars.

#### Via p42/p44 MAP cinasa

En aquesta via, a més dels IRS, també existeix un altre substrat directe del receptor, que és la proteïna SHC. Tant les tirosines fosforilades dels IRS com les de la SHC serveixen de punt d'unió a la proteïna GRB2, la qual s'hi uneix mitjançant el seus dominis SH2. La proteïna GRB2, amb els seus dominis SH3, també s'uneix a la SOS i permet així l'aproximació d'aquesta última a la p21 RAS. A continuació, SOS activa p21 RAS mitjançant un intercanvi de guanines (p21 RAS-GDP a p21 RAS-GTP) i dona lloc a l'estimulació seqüencial de diverses cinases citoplasmàtiques, les quals es van fosforilant i activant les unes a les altres: la RAF-1, la MEK, ERK 1/2 i la p90 RSK.



### 3. EL TEIXIT ADIPÓS

#### 3.1. CARACTERÍSTIQUES MORFOLÒGIQUES I ANATÒMIQUES

En els organismes superiors existeixen dos tipus de teixit adipós: el teixit adipós blanc i el marró. Ambdós tipus de teixit es diferencien per la seva morfologia i localització anatòmica i per les funcions que desenvolupen.

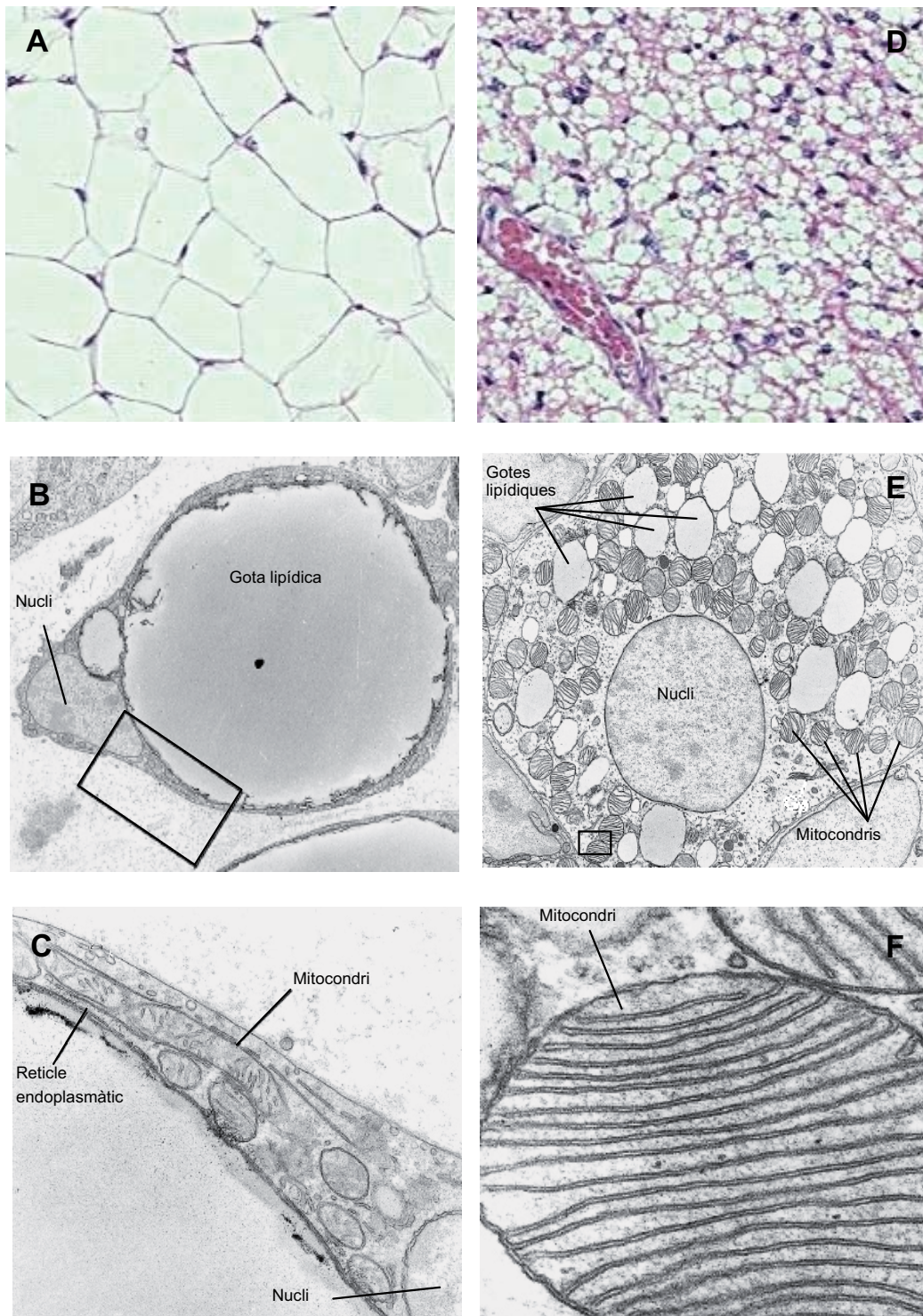
El teixit adipós blanc està constituït majoritàriament per preadipòcits i adipòcits madurs. Morfològicament, l'adipòcit blanc madur es caracteritza per la seva forma esfèrica i per la presència d'una sola gota lipídica en el seu citoplasma, que l'ocupa quasi totalment desplaçant el nucli i els orgànuls citoplasmàtics a un costat (vegeu les figures 7A, 7B i 7C).

El teixit adipós marró el formen uns adipòcits de mida inferior (30-40  $\mu\text{m}$ ) que els del teixit adipós blanc (60-100  $\mu\text{m}$ ). Aquests acumulen el greix en diferents gotes lipídiques, les quals ocupen una menor proporció del citoplasma que la dels adipòcits blancs. Una altra característica que els diferencia és l'elevat nombre de mitocondris que contenen per tal de dur a terme la seva funció termogènica (vegeu les figures 7D, 7E i 7F).

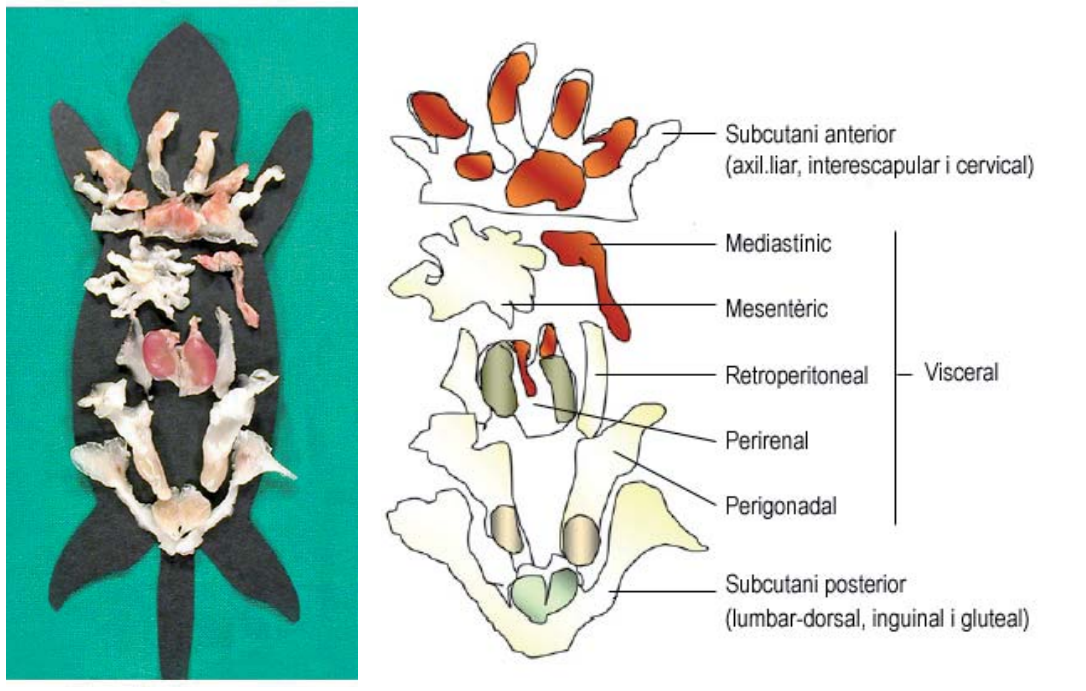
L'òrgan adipós està compost per diversos dipòsits, de tipus subcutani i visceral, distribuïts per tot l'organisme. En els múrids, els dipòsits subcutanis més importants són els denominats anterior i posterior. El primer se situa a les espatlles i s'expandeix fins a la zona cervical i axil·lar, i el segon el trobem en les regions lumbar, glútia i inguinal. Els dipòsits viscerals es localitzen a l'interior de les cavitats toràcica, abdominal i pèlvica, i aquestes dues últimes són les que contenen els més extensos (vegeu la figura 8) (Cinti, 2005). Tots els dipòsits adiposos estan formats per una combinació de teixit adipós blanc i marró: el teixit adipós blanc n'és el component principal de la major part i el marró en canvi, té una distribució més restringida. En el cas dels múrids, el teixit adipós marró només es pot detectar macroscòpicament en el dipòsit subcutani anterior i en el visceral mediastínic; en la resta s'hi troba de forma més dispersa (vegeu la figura 8) (Cinti, 2005). En humans, el teixit adipós marró es presenta sobretot en nadons, localitzat en la zona interescapular. En l'edat adulta és encara més escàs i només es detecten alguns adipòcits marrons aïllats, escampats entre el teixit adipós blanc (Garruti i Ricquier, 1992).

El balanç entre teixit adipós blanc i marró també es pot veure modificat per les condicions fisiopatològiques en les quals es troba l'individu. Per exemple, en animals aclimatats al fred aquest balanç es decanta a favor del teixit adipós marró, mentre que en una situació d'obesitat, és el teixit adipós blanc el que incrementa (Cinti, 2005).

FIGURA 7 : Morfologia del teixit adipós blanc (A, B i C) i marró (D, E i F) (Cinti, 2001).



**FIGURA 8:** Principals dipòsits de teixit adipós. Es mostra la localització anatòmica dels principals dipòsits de teixit adipós en una rata mascle: la coloració més marró o blanca reflecteix la proporció de teixit adipós marró o blanc, respectivament, en el dipòsit (Figura modificada de Cinti, 2006).



### 3.2. FUNCIONS DEL TEIXIT ADIPÓS

La principal funció del teixit adipós en el seu conjunt és el manteniment de l'homeòstasi energètica. Les diferents especialitzacions de l'adipòcit blanc i marró és essencial per aconseguir aquesta missió.

L'adipòcit blanc, d'una banda, té la capacitat d'emmagatzemar i mobilitzar triglicèrids, la qual cosa li permet actuar com a reservori energètic (Coppack *et al.*, 1994). Malgrat que aquesta funció d'emmagatzematge ha estat l'única que se li ha atribuït durant molt de temps, en els últims 15 anys nombroses evidències han revelat l'important paper que desenvolupa també com a cèl·lula endocrina.

L'adipòcit marró també té la capacitat de sintetitzar i emmagatzemar triglicèrids i alliberar àcids grassos no esterificats i glicerol, tot i que el que realment el caracteritza funcionalment és la seva especialització en la termogènesi adaptativa. Aquesta la realitza desacoblant la cadena respiratòria i produint calor en comptes d'ATP per mitjà de l'expressió específica de la proteïna UCP1 en la membrana mitocondrial.

### 3.3. CREIXEMENT DEL TEIXIT ADIPÓS BLANC

El teixit adipós blanc té una capacitat d'expansió molt superior a la de qualsevol altre teixit de l'organisme. Els valors considerats normals del percentatge de massa adiposa respecte al pes corporal són d'un 9-18% en homes i d'un 14-28% en dones. Malgrat els marges relativament estrets d'aquest grup considerat "normal", la gran plasticitat del teixit adipós fa possible que la massa adiposa pugui oscil·lar des d'un 2-3% en atletes amb una perfecta condició física a un 60-70% en obesos mòrbids (Hausman *et al.*, 2001).

El creixement del teixit adipós implica dues respostes cel·lulars de l'adipòcit: la hipertròfia o augment de la mida cel·lular, i la hiperplàsia o augment del nombre de cèl·lules. La hipertròfia dels adipòcits és fruit d'un increment en l'emmagatzematge de triglicèrids en els adipòcits ja existents. La hiperplàsia, en canvi, és el procés pel qual s'obtenen nous adipòcits a partir de la proliferació i diferenciació (adipogènesi) dels seus precursors, els preadipòcits. Durant el desenvolupament de l'obesitat, el teixit adipós creix combinant els dos mecanismes d'expansió de forma cíclica, precedint sempre la hipertròfia a la hiperplàsia (Bjorntorp, 1974; Faust *et al.*, 1978; Johnson *et al.*, 1978; Johnson *et al.*, 1971). Per explicar aquest fenomen s'ha postulat l'anomenada hipòtesi de la mida crítica de l'adipòcit, segons la qual el procés de proliferació i diferenciació dels preadipòcits s'activaria quan els adipòcits madurs assoleixen un volum màxim crític, per tal d'obtenir una major població d'adipòcits i per tant, una major capacitat d'emmagatzematge. En aquest sentit, s'ha demostrat que després d'una lipectomia, el mecanisme d'expansió compensatòria del teixit adipós restant depèn de la mida inicial dels adipòcits que el conformen, amb predomini de la hipertròfia quan la mida dels adipòcits és reduïda, i de la hiperplàsia quan la seva mida és major (Mauer i Bartness, 1997; Mauer *et al.*, 2001). En la mateixa línia, en altres treballs s'ha observat que els adipòcits hipertròfics alliberen factors que actuen de forma paracrina i que indueixen el creixement i la diferenciació dels preadipòcits propers (Marques *et al.*, 1998).

La hipòtesi del "volum crític" o "mida crítica de l'adipòcit" fou plantejada fa més de 30 anys i a partir d'aquell moment, molts autors han seguit aportant evidències de la seva validesa. Tanmateix, altres aportacions científiques en aquest camp indiquen que, a part del volum crític de l'adipòcit, existeixen més factors implicats en el procés de creixement del teixit adipós. Una observació favorable a aquesta idea és que la modalitat de creixement canvia segons el dipòsit de teixit adipós. S'ha comprovat que aquestes diferències depenen de factors com el grau d'innervació i d'irrigació de cada regió de teixit adipós o la capacitat proliferativa inherent dels seus preadipòcits (DiGirolamo *et al.*, 1998).

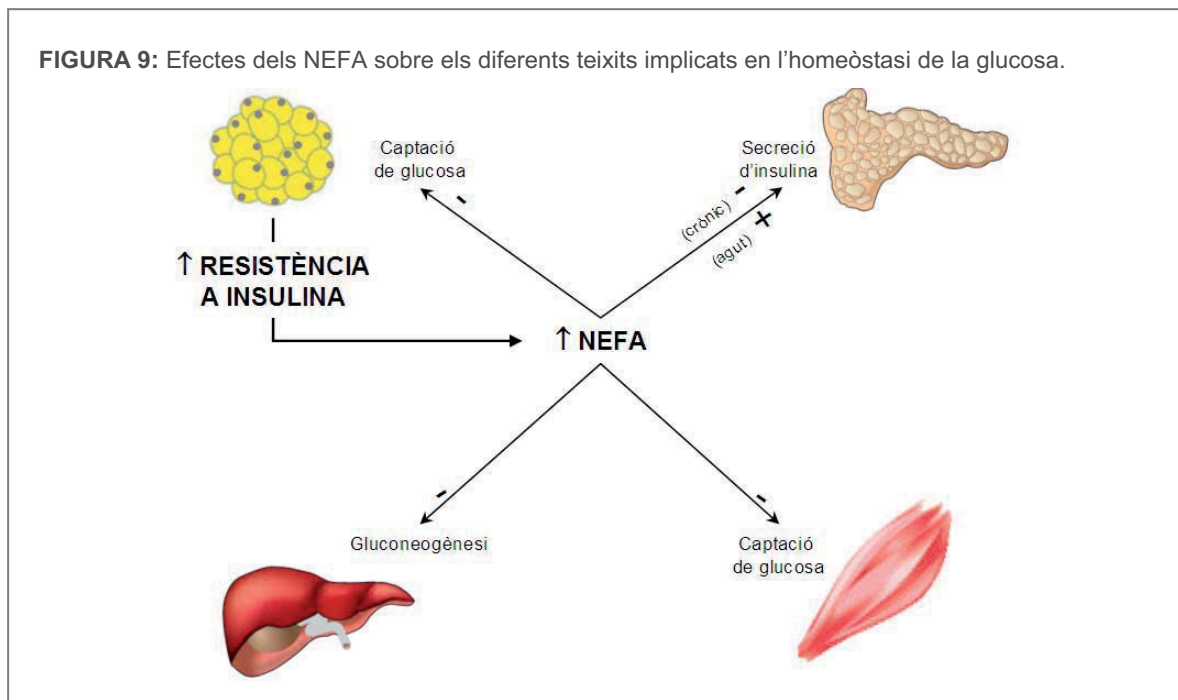


### 3.4. FUNCIÓ EMMAGATZEMADORA DEL TEIXIT ADIPÓS BLANC

El teixit adipós blanc està especialitzat en l'emmagatzematge i l'alliberació de les reserves energètiques en forma de triglicèrids. Gràcies a aquesta especialització, el teixit adipós constitueix el major reservori energètic de l'organisme, ja que els triglicèrids són les molècules biològiques a partir de les quals es pot obtenir més energia (9kcal/g), concretament, el doble d'altres substrats energètics com la glucosa i les proteïnes.

L'adipòcit blanc disposa de la maquinària enzimàtica necessària per dur a terme tant la síntesi com la degradació de triglicèrids. Aquests dos processos es denominen respectivament, lipogènesi i lipòlisi. En termes generals, durant l'estat absortiu en el teixit adipós s'activa la lipogènesi per emmagatzemar els àcids grassos lliures (NEFA) provinents de la dieta. En canvi, durant el període postabsortiu s'estimula el procés lipolític, que permet l'alliberament dels NEFA a la circulació i la seva utilització per part d'altres teixits (múscul esquelètic, fetge i ronyó). L'adipòcit també té la capacitat única de generar nous àcids grassos a partir d'altres substrats com la glucosa i alguns aminoàcids (lipogènesi de novo).

Qualsevol disfunció en l'habilitat del teixit adipós per emmagatzemar lípids té repercussions greus per al manteniment de l'homeòstasi de la glucosa. Un mostra d'aquest fet és l'alliberament anòmal de NEFA. En condicions normals, els NEFA són alliberats pel teixit adipós durant el període postabsortiu com una font energètica per a la resta de l'organisme i exerceixen accions en el metabolisme de la glucosa. Els NEFA circulants redueixen la captació de glucosa del mateix teixit adipós i del múscul i també promouen la gluconeogènesi hepàtica. L'efecte net d'aquestes accions és fer dels lípids la principal font d'energia dels teixits perifèrics, deixant la glucosa per al cervell i els glòbuls vermells, que en depenen totalment. En estats de resistència a insulina, com és el cas de l'obesitat, la repressió de la lipòlisi per part de la insulina és menor, i en conseqüència, les concentracions circulants de NEFA incrementen, la qual cosa provoca un seguit d'alteracions en el metabolisme de la glucosa (Roden *et al.*, 1996; Roden *et al.*, 2000). En el fetge, els NEFA estimulen la gluconeogènesi i l'alliberament de glucosa a la circulació. En múscul esquelètic alteren la captació de glucosa estimulada per insulina i augmenten l'activitat de la glicogen sintetasa. Les cèl·lules beta també poden veure's afectades pels NEFA dependent de la durada de la seva exposició; de forma aguda, els NEFA indueixen la secreció d'insulina, però a llarg termini el seu efecte és deleteri (Eldor i Raz, 2006). Aquestes accions dels NEFA incrementen encara més l'estat de resistència a insulina generalitzat i el seu alliberament pel teixit adipós, de manera que es crea un cercle viciós que contribueix a l'aparició d'hiperglucèmia (vegeu la figura 9).

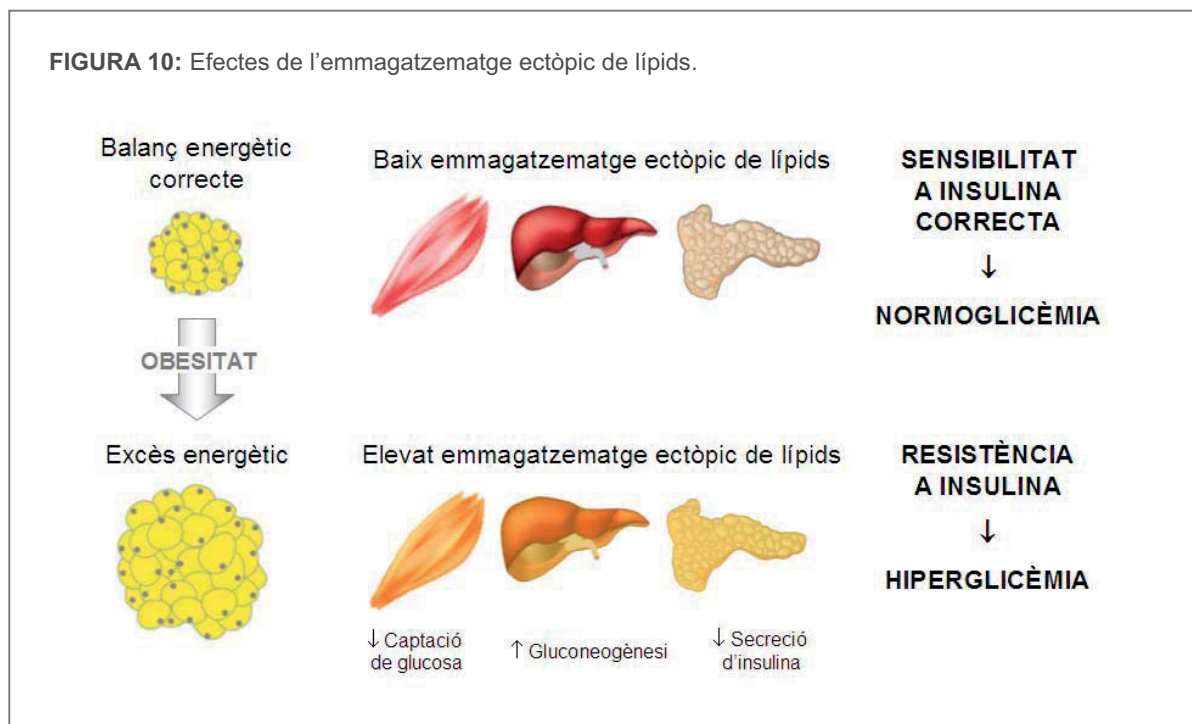


Quan el teixit adipós no és capaç d'acumular lípids correctament, l'homeòstasi de la glucosa també s'en ressenteix, en ser aquests emmagatzemats de forma ectòpica en altres teixits. Aquesta idea de "lípid ectòpic" va sorgir a partir de l'estudi d'animals o humans amb lipodistròfia, en els quals el teixit adipós no es desenvolupa adequadament i, en conseqüència, és molt escàs o totalment absent. En aquests, la manca de teixit adipós dona lloc a l'acumulació de l'excés energètic en forma de triglicèrids en fetge, múscul i cèl·lula beta i es desencadena resistència a insulina i hiperglucèmia (Robbins *et al.*, 1979; Robbins *et al.*, 1982). Diferents models animals avalen aquesta seqüència d'esdeveniments. En animals transgènics que tenen bloquejat el desenvolupament del teixit adipós també es presenta infiltració de lípids en múscul esquelètic i fetge, juntament amb resistència a insulina i intolerància a glucosa (Kim *et al.*, 2000; Reitman *et al.*, 1999; Shimomura *et al.*, 1999). El trasplantament de teixit adipós a aquests animals millora el patró metabòlic i la sensibilitat a insulina (Gavrilova *et al.*, 2000).

El balanç energètic positiu que es dona en l'obesitat provoca un patró similar al de la lipodistròfia: acumulació de l'excés lipídic en fetge i múscul, seguida de resistència a insulina, intolerància a glucosa i diabetis (Ryysy *et al.*, 2000; Seppala-Lindroos *et al.*, 2002). Aquesta observació demostra que, com en el cas de la lipodistròfia, en l'obesitat, la massa de teixit adipós és inadequada per segrestar els lípids de la dieta (vegeu la figura 10).

Com ja s'ha comentat en l'apartat anterior, el teixit adipós s'expandeix emprant dos mecanismes de forma alternativa, la hipertròfia i la hiperplàsia. Segons alguns autors, una baixa hiperplàsia del teixit adipós podria impedir que es donés l'expansió necessària

del mateix en resposta a l'excés energètic, el que causaria una acumulació ectòpica de lípids en altres teixits i on s'hi desencadenaria resistència a insulina. Aquesta hipòtesi és recolzada pel mecanisme d'acció de les tiazolidindiones (TZD), una família de fàrmacs que milloren la sensibilitat a insulina i disminueixen la glucèmia en models animals i pacients afectats de DM2. Les TZD promouen la diferenciació de nous adipòcits activant PPAR- $\gamma$ , un factor de transcripció essencial per a l'adipogènesi (Adams *et al.*, 1997). *In vivo*, el tractament amb TZD causa un augment del teixit adipós subcutani mitjançant una remodelació del mateix, que inclou l'aparició d'adipòcits de mida menor i una reducció dels més hipertrofiats (de Souza *et al.*, 2001; Nadler i Attie, 2001). Les TZD, doncs, tot i que augmenten l'adipositat, milloren la sensibilitat a insulina i disminueixen els lípids ectòpics (Hockings *et al.*, 2003), generant nous adipòcits i permetent una major capacitat d'emmagatzematge del teixit adipós a través de la seva expansió.



Com es descriurà en l'apartat següent, el teixit adipós no només és crític per al manteniment de l'homeòstasi de la glucosa gràcies a la seva funció emmagatzemadora sinó també secretora. Una observació molt il·lustrativa d'aquest fet és que quan a un animal lipodistròfic se li trasplanta teixit adipós d'un animal deficient en leptina (adipocitocina secretada pel teixit adipós) la millora de les anomalies metabòliques és molt inferior a l'observada quan el trasplantament és de teixit adipós d'un animal control (Colombo *et al.*, 2002). Aquest estudi demostra que el segrest de triglicèrids en teixit adipós no és suficient per si sol per restaurar la sensibilitat a insulina. En aquest sentit, el

fet que la leptina exògena pugui millorar l'homeòstasi de la glucosa en la lipodistròfia, ja sigui per si sola (Shimomura *et al.*, 1999) o en combinació amb l'adiponectina (Yamauchi *et al.*, 2001), també indica que la funció endocrina de l'adipòcit és indispensable per a la regulació del metabolisme de la glucosa.

### 3.5. FUNCIO ENDOCRINA DEL TEIXIT ADIPÓS BLANC

En els darrers anys nombrosos estudis han canviat la visió que es tenia del teixit adipós blanc, que ha passat de ser considerat un teixit emmagatzemador inert a ser reconegut com a un òrgan secretor molt dinàmic, capaç de produir nombrosos pèptids bioactius, anomenats adipocitocines. Aquestes adipocitocines poden ser secretades tant de manera local, amb efectes paracrins o autocrins, com de forma endocrina, en el torrent sanguini, exercint potents efectes en altres òrgans i teixits distants. A continuació descriurem les adipocitocines més rellevants fent especial referència al paper que tenen en el desenvolupament de la resistència a insulina i la DM2, el qual també se sintetitza en la figura 11.

#### Leptina

La leptina fou descoberta en 1994, quan es va identificar per clonatge posicional una mutació desactivant en el seu gen codificant, que causava el fenotip extremadament obès del ratolí *ob/ob* (Zhang *et al.*, 1994). Malgrat les expectatives creades a partir d'aquesta troballa, posteriorment es va poder observar que la immensa majoria dels casos d'obesitat comuna en humans no són causats per una deficiència en leptina sinó que es caracteritzen per la presència d'elevades concentracions de leptina en plasma, juntament amb un estat de resistència a aquesta que atenua la seva acció (Bjorbaek i Kahn, 2004). La leptina és sintetitzada principalment per adipòcits madurs del teixit adipós blanc. L'expressió de leptina i la seva concentració en sang són proporcionals a la massa de teixit adipós i l'estat nutricional (Frederich *et al.*, 1995; Maffei *et al.*, 1995), de manera que els trobem incrementats en l'obesitat i decauen en estats de restricció calòrica o pèrdua de pes.

Des del seu descobriment, la leptina ha centrat l'atenció sobretot pel paper fonamental que té en la regulació de l'homeòstasi energètica. En aquest sentit, es poden distingir dos àmbits principals d'acció de la leptina: el sistema nerviós central (SNC) i els teixits perifèrics. Els seus efectes centrals són els més ben caracteritzats: d'una banda la leptina actua sobre certes poblacions neuronals de l'hipotàlem reprimint la ingesta, concretament inhibint les neurones productores dels neuropèptids orexigènics NPY i

AGRP i estimulant les que alliberen els neuropèptids anorexigènics POMC i CART (Elias *et al.*, 1999). D'altra banda, també per via hipotalàmica, estimula el sistema nerviós simpàtic (SNS) i condueix a una major despesa energètica per mitjà d'un increment en la termogènesi del teixit adipós marró. Per via simpàtica també modula el metabolisme lipídic afavorint la lipòlisi i la  $\beta$ -oxidació en contra de la síntesi de triglicèrids i, per tant, reduint els dipòsits de lípids en els teixits (Haynes *et al.*, 1997). Aquest efecte lipopènic també el du a terme a nivell perifèric, actuant directament sobre els seus receptors en teixits claus del metabolisme com el múscul, el fetge, el pàncrees i el mateix teixit adipós (Muoio i Lynis Dohm, 2002).

En els darrers anys, diversos estudis han demostrat que la leptina exerceix efectes notoris sobre el metabolisme de la glucosa que, almenys en cert grau, no són conseqüència directa dels canvis en la ingesta o la massa de teixit adipós. En models animals deficientes en leptina, a part del fenotip obès, també es presenta una important resistència a insulina i un elevat risc de desenvolupar diabetis. Aquestes alteracions, causades per la manca de leptina, són corregides amb l'administració de leptina exògena i abans que es detectin canvis en el pes (Farooqi *et al.*, 2002; Munzberg i Myers, 2005; Pelleymounter *et al.*, 1995).

La leptina millora el metabolisme de la glucosa per mecanismes diversos i actuant tant en el SNC com en diferents teixits perifèrics. Segons alguns autors, la leptina pot regular el metabolisme de la glucosa a través de receptors hipotalàmics situats en el nucli arcuat. En models animals deficientes en el receptor de leptina, la restauració de l'expressió del receptor en el nucli arcuat millora marcadament la sensibilitat a insulina i la glucèmia sense observar-se canvis importants en el pes o la ingesta (Coppari *et al.*, 2005). Per altra banda, les accions lipolítiques de la leptina que hem descrit abans, també provoquen una reducció de l'emmagatzematge ectòpic de lípids en múscul, fetge i pàncrees; així n'eviten els efectes lipotòxics i en conseqüència, millora la sensibilitat a insulina en aquests teixits.

Finalment, també ha estat descrita l'existència d'un eix adipoinsular en el qual la leptina modula específicament la funció de la cèl·lula beta inhibint tant la síntesi com la secreció d'insulina, i aquesta última incideix sobre el teixit adipós on fa augmentar la producció de leptina (Covey *et al.*, 2006; Kieffer i Habener, 2000). Aquest efecte recíproc d'ambdues hormones contribuiria a mantenir els nivells d'insulina dins d'un rang de normalitat. En l'obesitat, però, en desenvolupar-se resistència a leptina, l'efecte inhibitori d'aquesta sobre la secreció d'insulina quedaria atenuat, fet que conduiria a un estat d'hiperinsulinèmia.

### Adiponectina

L'adiponectina, també anomenada apM1, Acrp30, GBP28 i AdipoQ (Hu *et al.*, 1996; Maeda *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1996; Scherer *et al.*, 1995), és una hormona alliberada específicament per l'adipòcit madur. Existeixen diferents isoformes de l'adiponectina, les quals circulen en elevades concentracions pel plasma, en forma de trímers, hexàmers i estructures oligomèriques d'ordre superior (Chandran *et al.*, 2003).

A diferència de la leptina, els nivells d'adiponectina disminueixen en l'obesitat, i la seva reducció o deficiència està directament relacionada amb els desordres que se'n deriven, com ara la resistència a insulina i la DM2. Diversos estudis epidemiològics han demostrat que en pacients amb resistència a insulina, causada per l'obesitat o altres patologies com la lipodistròfia, els nivells d'adiponectina es troben reduïts i l'administració d'aquesta millora els paràmetres metabòlics alterats en aquestes condicions (Chandran *et al.*, 2003; Diez i Iglesias, 2003; Kinlaw i Marsh, 2004; Yamauchi *et al.*, 2001). Aquests efectes de l'adiponectina també han estat confirmats en diversos models animals com el seu *knockout*, el qual desenvolupa resistència a insulina i intolerància a glucosa (Kubota *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2002).

L'adiponectina actua a través de dos receptors, ADIPOR1 i ADIPOR2 (Yamauchi *et al.*, 2003). Ambdós subtipus difereixen en les afinitats que presenten per cadascuna de les isoformes i oligòmers d'adiponectina. La seva expressió és pràcticament ubiqüa, tot i que cada receptor s'expressa diferencialment en determinats teixits. Per exemple, l'ADIPOR1 és més abundant en múscul, on l'adiponectina estimula la captació de glucosa i l'oxidació dels àcids grassos. En fetge, on predomina el receptor ADIPOR2, l'adiponectina actua també augmentant la captació de glucosa i l'oxidació d'àcids grassos, a més d'inhibint la gluconeogènesi.

En la cèl·lula beta s'expressen els dos receptors i, segons suggereixen alguns autors, l'adiponectina exerceix un efecte protector sobre la cèl·lula beta contribuint a mantenir una adequada secreció d'insulina en l'obesitat. En aquest sentit, s'ha pogut observar que l'adiponectina no té cap efecte sobre la secreció de d'insulina en illots d'animals o humans sans, però en canvi, en illots de ratolins amb obesitat induïda per dieta, hi exerceix un efecte dual inhibint la secreció d'insulina a baixa concentració de glucosa i estimulant-la a alta concentració de glucosa (Winzell *et al.*, 2004)

### PBEF/ Visfatina /eNampt

La visfatina fou identificada per primera vegada amb el nom de *pre-B-cell colony-enhancing factor* (PBEF), com a una nova citocina capaç d'estimular la maduració dels precursors dels limfòcits B (Samal *et al.*, 1994). Posteriorment, es descobrí que el seu gen era el mateix que codificava per a Nampt, un enzim citosòlic amb activitat nicotinamida fosforibosiltransferasa que participa en la biosíntesi de NAD (Rongvaux *et al.*, 2002). Finalment dos importants treballs l'han implicada en la regulació del metabolisme de la glucosa i la fisiopatologia de la diabetis però proposant diferents mecanismes d'acció (Fukuhara *et al.*, 2005; Revollo *et al.*, 2007).

El 2005 A. Fukuhara i col.laboradors reidentificaren la proteïna PBEF com una nova adipocitocina secretada predominantment pel teixit adipós visceral, motiu pel qual rebé el nom de visfatina. En aquest treball es mostrava que la visfatina posseïa propietats insulinomimètiques, demostrant la seva unió i activació del receptor d'insulina *in vitro* i la reducció de la glucèmia, sense modificar la insulinèmia, quan s'administrava *in vivo*. També es descrivia la correlació de la seva concentració plasmàtica amb el desenvolupament d'obesitat. Posteriorment, aquesta correlació en humans ha estat tan corroborada com desmentida per diferents autors (Chen *et al.*, 2006; Haider *et al.*, 2007; Oki *et al.*, 2007; Pagano *et al.*, 2006) i els resultats en què es demostraven les propietats insulinomimètiques de la visfatina encara han estat més qüestionats, en no poder ser reproduïts en una publicació de Revollo i col.laboradors apareguda el 2007.

En el seu treball Revollo i col.laboradors, a més d'intentar reproduir els resultats de Fukuhara sense èxit, mostraren que la visfatina és la forma extracel·lular de l'enzim NAMPT (eNAMPT), la qual és secretada per una via no clàssica conservant l'activitat enzimàtica. És més, els seus resultats també impliquen la visfatina de manera important en la regulació del metabolisme de la glucosa i demostren que l'haplodeficiència de Nampt dóna lloc a una reducció significativa de la biosíntesi de NAD i, per tant, de la secreció d'insulina estimulada per glucosa, tant *in vitro* com *in vivo* (Revollo *et al.*, 2007).

### Resistina

La resistina fou descoberta l'any 2001 com un nou gen diana de les TZD en teixit adipós. Els autors d'aquest estudi mostraren que l'expressió de resistina disminuïa en presència de TZD i era major en models d'obesitat genètica o induïda per dieta. També observaren que l'administració de resistina a ratolins normals induïa resistència a insulina, mentre que la seva neutralització mitjançant anticossos millorava la sensibilitat a insulina de ratolins obesos (Steppan *et al.*, 2001). Aquest primer treball apuntà la resistina com a factor clau en la relació entre l'obesitat i la resistència a insulina, tot i que

posteriorment la descripció d'altres resultats contradictoris, com ara la disminució dels nivells de resistina en diversos models d'obesitat, ha posat en dubte aquesta teoria (Moore *et al.*, 2001; Way *et al.*, 2001).

En humans les discrepàncies han estat encara majors. En primer lloc, el patró d'expressió en humans és completament diferent del de ratolins. En ratolins, la resistina s'expressa predominantment en adipòcits blancs madurs (Steppan *et al.*, 2001) i en humans en medul·la òssia i cèl·lules mononuclears perifèriques (Fain *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2003). En segon lloc, tampoc la correlació entre l'increment dels nivells de resistina i la resistència a insulina de l'obesitat ha pogut ser consistentment demostrada en humans, amb l'aparició tant d'estudis a favor com en contra d'aquesta relació (Rea i Donnelly, 2004). D'altra banda, en els últims anys la resistina ha centrat de nou l'interès per la seva implicació en processos inflamatoris, un paper que concorda amb la seva expressió en cèl·lules mononuclears, la qual pot ser induïda per certes citocines proinflamatòries com el TNF $\alpha$  o la IL6 (Kaser *et al.*, 2003).

#### Factor de necrosi tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

El TNF $\alpha$  inicialment fou descrit com una citocina proinflamatòria alliberada per macròfags i limfòcits en resposta a un estímul inflamatori. Posteriorment, fou identificat també en teixit adipós, on s'expressa específicament en adipòcits i cèl·lules estromals vasculars (Fain *et al.*, 2004).

Actualment, hi ha un ampli consens a l'hora de considerar el TNF $\alpha$  un factor clau en el desenvolupament de la patogènesi associada a l'obesitat. Una evidència d'aquest fet prové de l'estudi de models animals deficientes en TNF $\alpha$  o els seus receptors (TNFR1 i TNFR2). En aquests animals s'observa que la supressió de les accions de TNF $\alpha$  confereix protecció contra la resistència a insulina i l'obesitat tant d'origen genètic com induïda per una dieta rica en greixos (Uysal *et al.*, 1997; Ventre *et al.*, 1997). Per altra banda, ha estat demostrat que l'expressió de TNF $\alpha$  en teixit adipós blanc augmenta en humans o models animals obesos i correlaciona positivament amb l'adipositat i la resistència a insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993; Jellema *et al.*, 2004).

Malgrat que el TNF $\alpha$  interfereix en molts processos metabòlics, la contribució real dels seus efectes endocrins es considera poc significativa. La concentració de TNF $\alpha$  en el corrent sanguini és més baixa que en els teixits, fet que suggereix que molts dels seus efectes són indirectes i conseqüència de les accions autocrines o paracrines que exerceix en el mateix teixit adipós.

En teixit adipós, el TNF $\alpha$  reprimeix l'expressió de gens implicats en la captació i l'emmagatzematge d'àcids grassos i glucosa, inhibeix factors de transcripció que



## Introducció

participen en l'adipogènesi i la lipogènesi i modifica l'expressió d'altres adipocitocines com la IL6 o l'adiponectina (Ruan *et al.*, 2002). Aquestes accions en teixit adipós provoquen un increment de la concentració de NEFA en sèrum i, en conseqüència, la inducció de resistència a insulina en diferents teixits. Per altra banda, el  $TNF\alpha$  també deteriora directament la senyalització d'insulina, alterant l'estat de fosforilació dels substrats del receptor d'insulina, l'IRS1 i l'IRS2, i provocant la seva ràpida degradació (Hotamisligil, 2003).

Pel que fa a les accions de  $TNF\alpha$  en cèl·lula beta, nombrosos estudis *in vitro* indiquen que  $TNF\alpha$  redueix la secreció estimulada d'insulina (Kwon *et al.*, 1999; Stephens *et al.*, 1999), indueix apoptosi (Tsiotra *et al.*, 2001) i deteriora la senyalització d'insulina (Zhang i Kim, 1995). Malgrat aquests resultats, les baixes concentracions de  $TNF\alpha$  en plasma, fan dubtar dels seus efectes endocrins sobre la cèl·lula beta i es creu que són les seves accions en teixit adipós les que tindrien una major repercussió sobre la funcionalitat d'aquesta.

### Interleucina 6 (IL6)

La IL6 és també una citocina proinflamatòria expressada i secretada per diversos tipus cel·lulars que inclouen els adipòcits i la fracció estromal del teixit adipós blanc (Fain *et al.*, 2004). La IL6, a diferència del  $TNF\alpha$ , es troba en elevades concentracions en el corrent sanguini i aproximadament un terç dels seus nivells circulants provenen de teixit adipós blanc (Fernandez-Real i Ricart, 2003), en el qual  $TNF\alpha$  és un potent estimulador de la seva secreció (Ruan *et al.*, 2002). L'expressió d'IL6 en teixit adipós i també la seva concentració circulant estan correlacionats positivament amb l'obesitat, la intolerància a glucosa i la resistència a insulina.

L'administració perifèrica de la IL6 indueix hiperlipidèmia, hiperglucèmia i resistència a insulina (Fernandez-Real i Ricart, 2003). Aquest efectes estan mitjançats per una reducció de l'expressió de diferents components de la via de senyalització de la insulina i per la inducció de SOCS3, un regulador negatiu tant de la via de senyalització de la insulina com de la leptina (Senn *et al.*, 2003). La IL6 també exerceix efectes autocrins i paracrins en el mateix teixit adipós, on inhibeix l'activitat LPL (Trujillo *et al.*, 2004) i disminueix la secreció d'adiponectina (Fasshauer *et al.*, 2003).

Els estudis realitzats *in vitro* exposant models de cèl·lula beta o illots a la IL6 indiquen que aquesta exerceix uns efectes protectors millorant la secreció d'insulina i la viabilitat de la cèl·lula beta (Choi *et al.*, 2004; Sandler *et al.*, 1990). En canvi, les altres accions de la IL6 descrites anteriorment, com la disminució de la senyalització d'insulina i

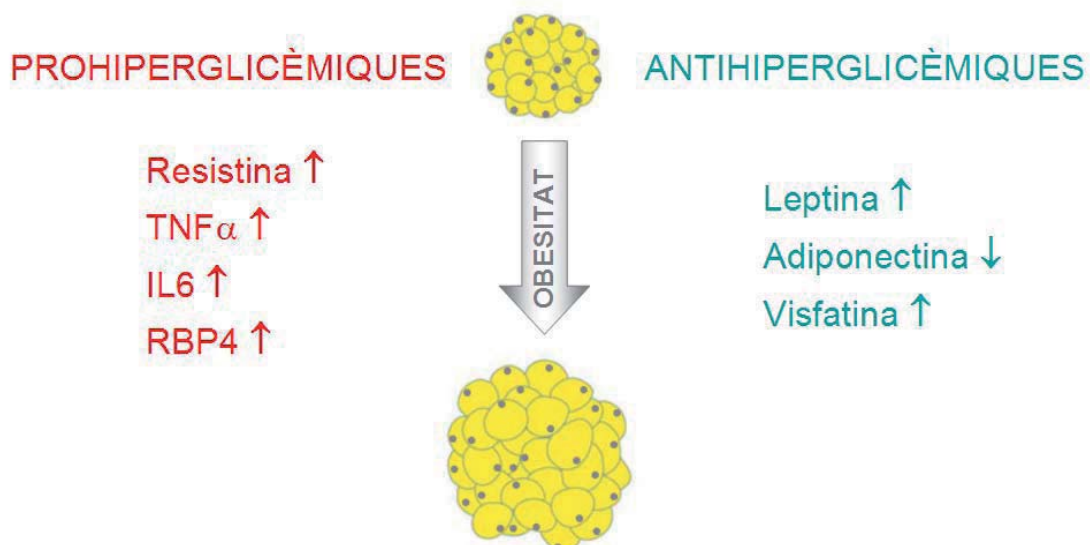
la reducció de la secreció d'adiponectina, tendrien a deteriorar la funcionalitat de la cèl·lula beta.

### Retinol-binding protein 4 (RBP4)

L'RBP4 fou descoberta a partir de l'estudi del *knockout* de GLUT4 específic de teixit adipós, el qual presenta un fenotip de resistència generalitzada a insulina. En l'anàlisi transcripcional del teixit adipós d'aquest model s'identificà una proteïna, l'RBP4, que era regulada per canvis en els nivells de GLUT4. La relació d'aquest factor amb la resistència a insulina fou constatada en observar que la sobreexpressió d'RBP4 reduïa l'acció de la insulina en fetge i múscul i que, en canvi, la seva supressió millorava la sensibilitat a insulina (Yang *et al.*, 2005).

Els nombrosos estudis epidemiològics posteriors que han seguit aquest primer treball donen suport a la implicació d'RBP4 en la patofisiologia de la DM2. El nivells d'RBP4 en sèrum es troben elevats en presència de resistència a insulina, tant en individus obesos, amb intolerància a glucosa o DM2, com en individus no obesos amb una història familiar de resistència a insulina (Graham *et al.*, 2006).

**FIGURA 11 : Efecte de les adipocitocines sobre l'homeòstasi de la glucosa.** La resistina, el  $TNF\alpha$ , la IL6 i l'RBP4 augmenten amb l'obesitat i exerceixen efectes negatius sobre la glucèmia, ja que indueixen resistència a insulina. En canvi, els efectes de la leptina i l'adiponectina es pot considerar que van encaminats a millorar la glucèmia, ja que d'una banda milloren la sensibilitat a insulina exercint una acció lipopènica en diferents teixits, i de l'altra, regulen la funció de la cèl·lula beta rectificant la hipersecreció d'insulina. Amb l'obesitat, aquestes accions es troben atenuades per la reducció dels nivells d'adiponectina i pel desenvolupament de resistència a leptina. La visfatina també podria ser clau per a mantenir una correcta secreció d'insulina i l'increment dels seus nivells en l'obesitat, que alguns autors han descrit, podria tractar-se d'una resposta compensatòria a la major demanda d'insulina que genera la resistència a insulina.



## 4. ELS FACTORS DE CREIXEMENT IGF1 I IGF2 I LES SEVES PROTEÏNES D'UNIÓ

En aquest apartat es descriuran breument els IGF i les seves proteïnes d'unió, les IGFBP, ja que una part important dels resultats d'aquesta tesi es centren en una d'aquestes proteïnes d'unió, la IGFBP3.

### 4.1. ELS FACTORS DE CREIXEMENT IGF1 I IGF2

Els factors de creixement IGF1 i IGF2 presenten una elevada homologia amb la insulina i pertanyen a la mateixa família que aquesta, la dels *insulin-like growth factors*. El seu principal òrgan productor és el fetge, que els allibera de forma endocrina a la circulació. L'hormona del creixement és el regulador més important de l'expressió i secreció d'IGF1. Aquesta, controla el creixement somàtic estimulando l'alliberació d'IGF1 principalment en el fetge. A diferència d'IGF1, l'expressió d'IGF2 no és regulada per l'hormona del creixement (Nielsen, 1992) i el seu paper és més rellevant durant el creixement fetal que en el postnatal. Els IGF no són produïts només pel fetge sinó que també s'expressen en la major part de la resta de teixits, on actuen de manera autocrina o paracrina regulant la diferenciació, el creixement i el metabolisme cel·lular (Le Roith *et al.*, 2001a; Le Roith *et al.*, 2001b). La producció extrahepàtica dels IGF s'ha demostrat que també pot contribuir al creixement somàtic (Sjogren *et al.*, 1999; Yakar *et al.*, 2002). Com s'explica més extensament en l'apartat 2.2.3 d'aquesta introducció, els IGF també promouen el creixement i la supervivència de la cèl·lula beta i es troben implicats en el procés d'expansió de massa de cèl·lula beta que es dona en resposta a la resistència a insulina.

Les accions biològiques d'IGF1 i IGF2 són mitjançades pel receptor IGF1R, un membre de la família dels receptors tirosina-cinasa. Atesa l'elevada homologia entre els IGF i la insulina i entre els seus receptors, és possible la unió creuada entre ells, encara que amb una menor afinitat (Werner *et al.*, 2008). El patró d'expressió d'aquests receptors varia entre diferents teixits; així, per exemple el receptor d'insulina és molt abundant en teixit adipós i en fetge, en canvi, en les cèl·lules beta predomina el d'IGF, fet que explicaria que la insulina o els IGF puguin mostrar efectes diferents segons el teixit on actuen (Dupont i LeRoith, 2001). L'IGF2 a més, posseeix un receptor específic, el receptor IGFII/M6P. Aquest, a diferència dels IR i IGF1R, és de tipus glicoproteïna transmembrana, acoblat a proteïna G i no presenta activitat tirosina-cinasa. La seva funció no és transduir el senyal d'IGF2, sinó mitjançar la seva internalització i eliminació en els lisosomes.

## 4.2. LES PROTEÏNES D'UNIÓ ALS IGF

Els IGF són transportats en la circulació per les seves proteïnes d'unió, les *Insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBP), a les quals s'uneixen amb elevada afinitat. Aquestes proteïnes es troben estretament relacionades entre elles estructuralment i formen part d'una mateixa família constituïda per sis membres (IGFBP1-IGFBP6).

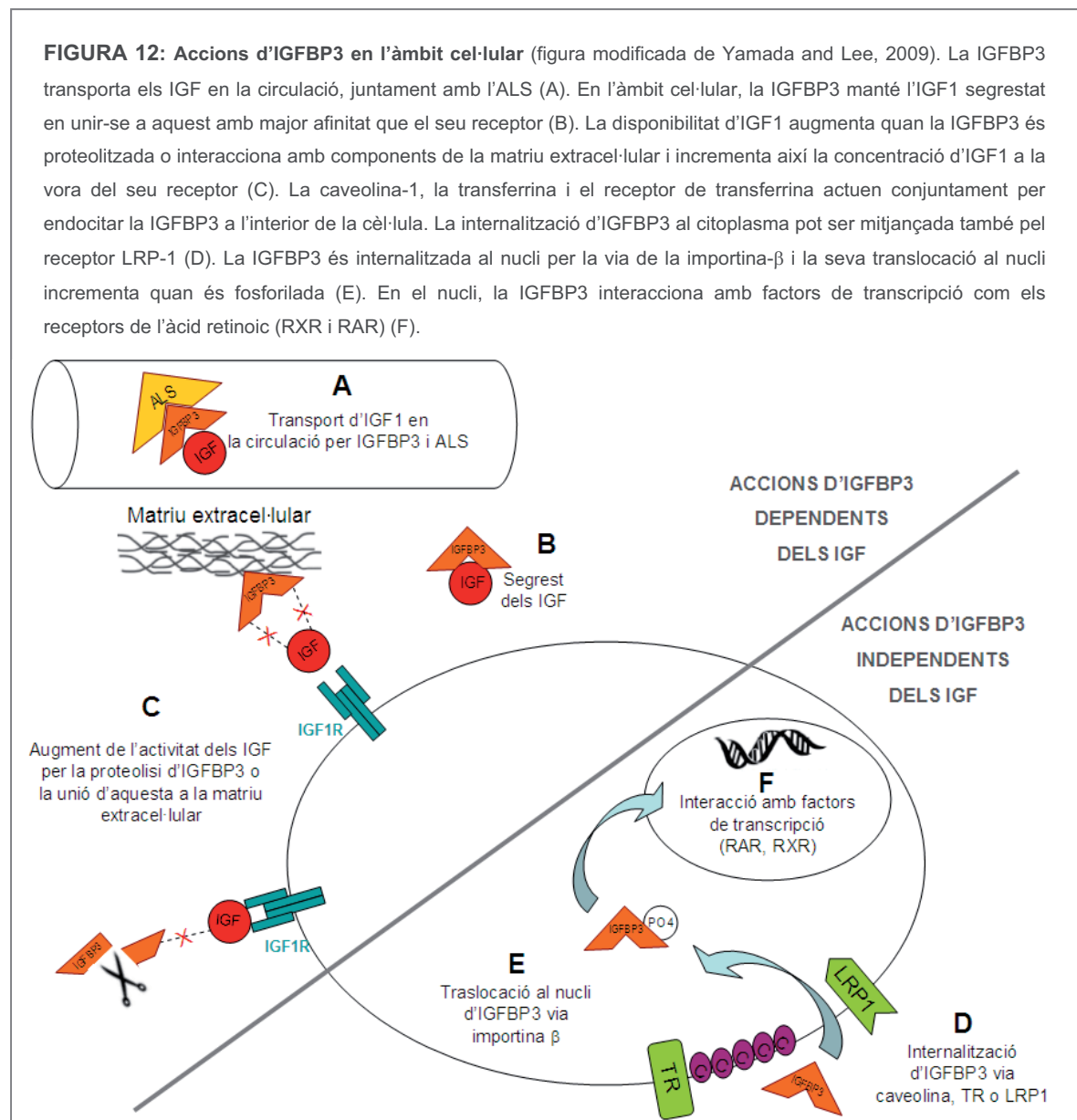
Les IGFBP modulen l'activitat dels IGF de diferents maneres. Les 6 són presents tant en la circulació com localment i els IGF es troben predominantment units a elles. Els complexos formats per les IGFBP i els IGF varien en funció de l'ambient, i així com en els teixits són binaris (IGFBP/IGF), en la circulació, la major part dels IGF circulen units a la IGFBP3 o la IGFBP5, però a més, aquestes últimes s'associen a una tercera proteïna, la subunitat àcid làbil (ALS). De fet, aproximadament un 75% de l'IGF1 circulant es troba unit a l'ALS i a la IGFBP3. Aquest complex ternari, de 150 KDa, no pot travessar la barrera endotelial i, en conseqüència, evita la ràpida eliminació dels IGF i també en limita la bioactivitat impedit el seu accés als teixits (Guler *et al.*, 1989; Lewitt *et al.*, 1993). Els complexos binaris, formats únicament per una de les IGFBP i un dels IGF, sí que poden abandonar la circulació i per tant, perquè els IGF arribin als teixits només es requereix la dissociació dels complexos ternaris formats amb l'ALS.

La vida mitjana de l'IGF1 circulant lliure és de 10 minuts, però aquesta es prolonga fins a 30-90 minuts quan forma part d'un complex binari, o fins a 12 hores quan es troba segregat en el complex ternari (Guler *et al.*, 1989). Les concentracions circulants d'IGF1 són molt elevades, al voltant de 100 nM en humans, i molt superiors a les requerides per activar el receptor IGF1R, d'1 nM o 2 nM. En els teixits, les concentracions d'IGF1 es redueixen a una tercera part de les que es troben en la circulació, però segueixen excedint moltíssim les necessàries per regular l'activitat cel·lular (Holly, 2004). Així doncs, tant en la circulació com en els teixits existeix un gran reservori d'IGF1, el qual és possible gràcies als complexos binaris i terciaris que forma amb les IGFBP i l'ALS.

Tant les IGFBP, com els IGF, són secretats principalment pel fetge de manera endocrina, però també són sintetitzades per la majoria de teixits. Entre aquests teixits es troba el teixit adipós, com s'explicarà a continuació, i el pàncrees. En aquest últim, s'ha detectat l'expressió d'IGFBP1 i d'IGFBP2 preferentment després del període postnatal (la primera es localitza en els illots i la segona en cèl·lules acinars a més de'n els illots). La IGFBP3, la IGFBP4 i la IGFBP5, també han estat identificades en illots durant el període fetal i postnatal, sobretot associades a la capa de cèl·lules alfa. També s'ha comprovat que l'origen de les IGFBP en pàncrees pot ser exogen, com demostra el fet que certs tipus cel·lulars presenten immunoreactivitat per algunes IGFBP sense expressar-les (Hill *et al.*, 1999; Hogg *et al.*, 1994).

## Introducció

En els teixits, les IGFBP, produïdes localment o procedents de la circulació, inhibeixen els IGF en unir-se a aquests amb major afinitat que el seu receptor IGF1R (Li *et al.*, 1997). La unió de les IGFBP als IGF, i per tant, la inhibició d'aquests, pot ser anul·lada mitjançant la proteòlisi de les IGFBP per part de proteases específiques (Fowlkes *et al.*, 1994). En certes circumstàncies, les IGFBP també poden facilitar l'acció dels IGF augmentant-ne la concentració a la vora dels seus receptors, en interaccionar amb components de la matriu extracel·lular (Conover i Powell, 1991) (vegeu la figura 12).



Certs mecanismes d'acció de les IGFBP són independents dels IGF. Les evidències en aquest sentit provenen d'estudis en què es descriuen els efectes antiproliferatius o proapoptòtics de les IGFBP emprant mutants de les mateixes que no es poden unir als IGF o línies cel·lulars que no expressen els IGF, ni els receptors d'aquests (Buckway *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2002; Valentinis *et al.*, 1995). Molts dels estudis d'aquestes accions independents s'han centrat en la IGFBP3. S'ha comprovat que aquesta participa en altres vies de senyalització a part de la dels IGF, fet que explicaria les seves accions independents. Per exemple, s'ha demostrat la unió de la IGFBP3 a receptors de membrana com el TGF- $\beta$  tipus V / LRP1 i la seva internalització fins al nucli, on interacciona amb els receptors nuclears de l'àcid retinoic, RXR i RAR. També s'ha observat que la IGFBP3 és induïda directament per diversos factors o hormones com l'àcid retinoic, els antiestrògens, el TGF $\beta$ , el p53, etc., i actua facilitant o ampliant les accions inhibidores d'aquests sobre el creixement cel·lular (Yamada i Lee, 2009) (vegeu la figura 12).

### 4.3. L'IGF1 I LA IGFBP3 EN EL TEIXIT ADIPÓS

Com ja s'ha indicat anteriorment, els IGF i les seves proteïnes transportadores són secretats també pel teixit adipós. L'expressió d'IGFBP3 en teixit adipós és més aviat moderada comparada amb la del fetge o altres teixits. Respecte a l'IGF1, els estudis descrits mostren resultats contradictoris en detectar, alguns autors, que la seva expressió en teixit adipós és relativament baixa, i d'altres, que és tan elevada com la del fetge (Albiston i Herington, 1992; Gosteli-Peter *et al.*, 1994). Els IGF i les IGFBP mostren patrons d'expressió diferents en teixit adipós; així l'IGF1 s'expressa preferentment en els adipòcits madurs i en canvi, algunes IGFBP, com la IGFBP3, es troben més expressades en la fracció estromal (Peter *et al.*, 1993). El paper d'aquests factors en el teixit adipós encara no es coneix amb total precisió, però és evident que està relacionat amb la diferenciació i el metabolisme dels adipòcits.

Tant l'expressió d'IGF1 i com d'IGFBP3 incrementa durant l'adipogènesi, sobretot la del primer (Wabitsch *et al.*, 2000). Mentre que l'IGF1 estimula l'adipogènesi (MacDougald i Lane, 1995), la IGFBP3 la reprimeix; per tant, l'augment de l'expressió d'IGFBP3 durant aquest procés possiblement respon a un mecanisme d'autoregulació per limitar la diferenciació dels preadipòcits. Segons s'ha descrit en un estudi recent, la IGFBP3 interfereix en la diferenciació adipocitària inhibint un factor de transcripció crític per a aquest procés, el PPAR- $\gamma$  (Chan *et al.*, 2009). Els autors demostren que la IGFBP3 impedeix l'heterodimerització entre PPAR- $\gamma$  i el receptor nuclear RXR, necessària per

activar els gens diana de PPAR- $\gamma$ . En abolir la interacció d'IGFBP3 amb RXR o PPAR- $\gamma$  (emprant un mutant d'IGFBP3 al qual no es poden unir RXR i PPAR- $\gamma$ ) també queda anul·lada la repressió d'IGFBP3 sobre la diferenciació adipocitària.

En el mateix treball de Chan *et al.*, 2009 també es comprova que la IGFBP3 és capaç de modificar l'expressió dels adipòcits madurs alterant el seu estat diferenciat i, per tant, la seva funció. Observen que el tractament d'adipòcits 3T3-L1 amb IGFBP3 redueix l'expressió de diferents marcadors de diferenciació com el mateix PPAR- $\gamma$ , l'adiponectina o la resistina i, en canvi, indueix la d'altres que són més propis d'un estat preadipocitari com PAI-1. Un altre efecte de la IGFBP3 sobre la funció dels adipòcits descrit és la inhibició de la captació de glucosa estimulada per la insulina, que aconsegueix a través d'una menor translocació del transportador GLUT4 a la membrana cel·lular i també una menor fosforilació d'AKT. En aquest cas, el mecanisme d'acció d'IGFBP3 no requereix la interacció amb el receptor nuclear RXR, ni tampoc amb IGF1 (Chan *et al.*, 2005).

En conjunt aquestes dades, obtingudes *in vitro*, evidencien el paper clau d'IGFBP3 en el teixit adipós i, per extensió, en el metabolisme general. Els estudis *in vivo* donarien suport també a aquesta important funció metabòlica, ja que tant el transgènic com el *knockout* d'IGFBP3, a part d'anomalies en el creixement, també presenten certes alteracions metabòliques. El transgènic es caracteritza per la presència d'hiperglucèmia en dejú, intolerància a glucosa i menor captació de glucosa per part del teixit adipós i el múscul en resposta a la insulina (Silha *et al.*, 2002). Pel que fa al *knockout*, l'específic d'IGFBP3 no manifesta cap fenotip destacat, fet que s'atribueix a la compensació per altres IGFBP i, per aquest motiu, existeix un únic estudi publicat en què només es mostren els resultats obtinguts amb un triple *knockout* d'IGFBP3, IGFBP4 i IGFBP5 (Ning *et al.*, 2006). Aquest *knockout* presenta una millora del metabolisme glucèmic respecte als animals control. La seva tolerància a glucosa és superior i, després de l'administració de glucosa, presenta una àrea sota la corba de glucèmia menor que la dels animals control. En el test de tolerància a glucosa també s'observa que la insulinèmia dels *knockouts* és més elevada, tot i que no mostren resistència a insulina. En investigar l'origen de la hiperinsulinèmia dels *knockouts*, els autors detecten un increment del 37% en la seva àrea de cèl·lula beta pancreàtica.

La interpretació dels fenotips presentats per aquests models no és fàcil tenint en compte el caràcter pleiotròpic d'IGFBP3 i de la resta d'IGFBP. Per exemple, tant en el transgènic com en el *knockout* es produeixen alteracions importants en la concentració circulat d'IGF1 que poden contribuir de manera important al fenotip observat. Tanmateix, aquest fet no descarta que gran part de les alteracions observades puguin ser conseqüència directa de les accions de les IGFBP o de la manca d'aquestes.

## **II. HIPÒTESI I OBJECTIUS**





Per tal de garantir la normoglicèmia, la cèl·lula beta és capaç d'adaptar la producció d'insulina a la demanda de la mateixa. Per aconseguir aquest ajust tan precís es produeixen canvis, tant en la secreció d'insulina de cada cèl·lula beta, com en la massa total de cèl·lules beta del pàncrees. Aquest últim mecanisme d'adaptació és molt important en totes les situacions que impliquen una major demanda d'insulina. Una mostra d'aquest fet és que en l'obesitat es produeix una expansió de la massa de cèl·lula beta per tal de contrarestar la resistència a insulina creixent, i només quan aquesta resposta és prou eficient s'aconsegueix evitar l'aparició de la DM2. Malgrat la importància d'aquesta resposta, els mecanismes que la controlen o els factors capaços d'activar-la encara no es troben ben definits.

El teixit adipós també té un paper clau en la patogènesi de la DM2, en part, perquè en l'obesitat, la seva capacitat d'emmagatzemar lípids és superada i, en conseqüència, es produeixen un seguit d'alteracions metabòliques que condueixen a un estat de resistència a insulina. A més d'aquesta funció de reservori energètic, el teixit adipós també en du a terme una altra de tant o més important com a òrgan secretor. El teixit adipós és capaç d'incidir en multitud de processos fisiològics de tot l'organisme mitjançant la síntesi i la secreció d'adipocitocines, les quals poden actuar tant localment, com a través del corrent sanguini. Segons s'ha pogut comprovar, alguns dels factors alliberats pel teixit adipós posseeixen propietats proliferatives, les quals augmenten en condicions d'obesitat.

Tenint en compte la implicació del teixit adipós en la patogènesi de la DM2 i, sobretot, la important funció secretora que desenvolupa, la hipòtesi formulada en la qual es basa la present tesi és la següent:

El teixit adipós regularia l'expansió de la massa de cèl·lula beta que té lloc en l'obesitat a través de la secreció d'adipocitocines que incidirien sobre la replicació o altres mecanismes de plasticitat de la cèl·lula beta.

Els objectius concrets o passos que hem seguit per tal de verificar aquesta hipòtesi han estat els següents:

1. Caracteritzar un model d'obesitat, el de rata alimentada amb dieta de cafeteria, per tal de constatar que hi té lloc una expansió de la massa de cèl·lula beta i determinar els principals mecanismes de plasticitat de la cèl·lula beta que hi estan implicats.
2. Estudiar els efectes de diferents medis condicionats de teixit adipós, provinents de rates obeses i controls, sobre la proliferació de la cèl·lula beta; comprovant d'aquesta manera, si els factors alliberats pel teixit adipós poden mitjançar l'expansió de la massa de cèl·lula beta que té lloc en l'obesitat.
3. Cercar els possibles factors responsables dels efectes dels medis condicionats de teixit adipós sobre la proliferació de la cèl·lula beta.



### **III. MATERIAL I MÈTODES**



## 1. OBTENCIÓ DEL MODEL EXPERIMENTAL

### 1.1. JUSTIFICACIÓ DE L'ELECCIÓ DEL MODEL EXPERIMENTAL

La nostra intenció era treballar amb un model en el que l'etiopatogènia de l'obesitat fos el més semblant possible a la dels humans, per aquest motiu, vàrem optar per un model d'obesitat induïda mitjançant dieta, i no originat per una modificació genètica. El model d'obesitat concret que vàrem emprar fou el de dieta de cafeteria, que descriurem a continuació, el qual ja havia estat posant a punt prèviament en el nostre laboratori (Claret *et al.*, 2004; Claret *et al.*, 2005). Vàrem escollir aquesta dieta per la seva semblança amb el tipus de dieta que causa l'obesitat en els humans i perquè permet l'obtenció d'un elevat guany de pes corporal en un temps relativament curt.

### 1.2. ANIMALS, DIETES I INDUCCIÓ A L'OBESITAT

Tots els animals utilitzats en aquesta tesi es varen obtenir de l'empresa Charles River (Wilmington, MA, EUA) i es varen mantenir a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Els protocols experimentals es realitzaren seguint les normes de manipulació d'animals d'experimentació i foren prèviament autoritzats pel comitè ètic d'experimentació animal de la Universitat de Barcelona.

Els animals emprats sempre varen ser rates mascles (*rattus norvegicus*), de la soca Wistar i de 7 setmanes d'edat (225-250 g). Aquestes es varen mantenir, individualitzades, en condicions controlades d'estabulació (temperatura de  $21 \pm 2$  °C, humitat relativa del 50-60%, cicles de llum i fosc de 12 hores).

Els animals varen ser alimentats *ad libitum* amb una dieta de pinso estàndard (tipus AO4, Panlab, Barcelona, Espanya) (rates CTRL) o bé amb la dieta de cafeteria esmentada prèviament (rates CAF), durant 10, 30 o 60 dies. L'accés a l'aigua de beguda va ser lliure durant tot el procés experimental per a ambdós grups dietètics. El protocol de la dieta de cafeteria aplicat va consistir en l'administració diària (a primera hora del matí) i en excés d'un ventall d'aliments d'elevada palatabilitat i contingut en lípids i carbohidrats. La composició d'aquesta dieta ha estat prèviament descrita en Claret M (2004):

- Pinso estàndard (AO4, Panlab) (3,0 Kcal/g)
- Galetes tipus Maria (4,7 Kcal/g)
- Paté de fetge de porc (3,6 Kcal/g)
- Cansalada (6,6 Kcal/g)
- Llet sencera amb 333 g/l de sucre i 10 g/l d'un suplement vitamínic i mineral amb sabor de xocolata (Gevral, Cynamid Ibèrica, Madrid, Espanya) (1,98 Kcal/ml)

La composició de nutrients i l'energia derivada de cada nutrient en les dues dietes emprades s'indiquen en la taula 3:

TAULA 3: Composició de la dieta de cafeteria

	DIETA DE PINSO ESTÀNDAR		DIETA DE CAFETERIA	
	Nutrients (%)	Energia derivada (%)	Nutrients (%)	Energia derivada (%)
<b>Proteïnes</b>	15,5	21	12,7	9
<b>Lípids</b>	3,3	8	38,7	65
<b>Carbohidrats</b>	68,8	71	36,1	25
<b>Altres</b>	10,4	-	13,0	-
<b>Energia total (Kcal/g)</b>	3		5,5	

## 2. PROTOCOL D'EXTRACCIÓ I OBTENCIÓ DE FLUIDS I TEIXITS

### 2.1. OBTENCIÓ DE SANG, PLASMA I SÈRUM

Durant el període de tractament, les mostres de sang es varen obtenir a partir de la vena caudal mitjançant un sistema capil·lar impregnat amb EDTA (Sarsted, Nümbrecht, Alemanya). Les mostres es mantingueren en gel des de la seva extracció fins al seu processament per a l'obtenció de plasma (centrifugant a 1.000 g, durant 20 minuts i a 4 °C).

Al final de l'experiment s'obtingué sang sacrificant els animals per decapitació i es recollí la sang en tubs de plàstic sense anticoagulant i amb una fase separadora de sèrum (Vacutainer SST II Advarence®, Becton Dickinson, Plymouth, Regne Unit). Les mostres es varen mantenir en gel des de la seva extracció fins al seu processament per a l'obtenció de sèrum (centrifugant a 1500 g, durant 10 minuts i a 4 °C).

Totes les mostres de plasma i sèrum es conservaren a -20 °C fins al moment de la seva utilització.

### 2.2. OBTENCIÓ DE TEIXITS

Per a l'obtenció de teixit adipós, els animals (prèviament dejunats durant 4 hores) varen ser anestesiats per inhalació d'isofluorà (Forane, Abbot Laboratorios, Kent, Regne Unit) al 2% mitjançant un vaporitzador (Ohmeda, Madison, Wisconsin, EUA). Els diferents

dipòsits de teixit adipós (marró interescapular, inguinal subcutani, epididimari i pancreàtic mesentèric) es varen extreure, netejar amb PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) i pesar. Seguidament, segons el protocol pel qual havien de ser emprats, els teixits foren processats de diferent manera. Una part foren fixats en formalina per ser inclosos posteriorment en parafina (vegeu l'apartat 4.4). Alguns van ser processats per obtenir medi condicionat de teixit adipós (vegeu l'apartat 6). Altres foren congelats ràpidament en N<sub>2</sub> líquid i posteriorment es conservaren a -80 °C fins a realitzar l'extracció de proteïnes o d'RNA dels mateixos (vegeu els apartats 8 i 11). Finalment, alguns també van ser processats per separar les seves fraccions estromal i adipocitària i extreure'n l'RNA de cadascuna d'elles (vegeu l'apartat 8.1).

Tant per a l'extracció de pàncrees sencer com per a l'aïllament d'illots pancreàtics, els animals varen ser anestesiats per inhalació d'isofluorà i sacrificats per decapitació. Els pàncrees sencers es varen extreure, netejar amb PBS, pesar i fixar en formalina per ser inclosos posteriorment en parafina (vegeu l'apartat 4.4). Per a l'obtenció d'illots, després d'injectar col·lagenasa pel colèdoc dels animals, es va extreure el pàncrees i es va conservar en la mateixa solució de col·lagenasa i en gel fins a la posterior digestió en el laboratori (vegeu l'apartat 5.3).

### 3. MESURES METABÒLIQUES I PROVA DE TOLERÀNCIA A GLUCOSA

El test de tolerància a glucosa el realitzàrem en rates conscients i dejunades durant 5 hores, a les quals es va injectar, intraperitonealment, una solució de D-glucosa (Frenesius Kabi, Barcelona, Espanya) a 2 g per Kg de pes corporal. Es varen extreure mostres de sang 0, 15, 30, 60 i 120 minuts després de l'administració de glucosa. En aquestes mostres es varen dur a terme les mesures de glucèmia i insulinèmia tal com s'indica a continuació.

Per a la realització de les diverses mesures metabòliques, es varen emprar, segons s'indica, mostres de sang, plasma o sèrum. La determinació de la concentració circulat dels diversos paràmetres es va dur a terme mitjançant *kits* comercials i seguint els protocols especificats pels fabricants. A continuació es detalla la relació de les mesures realitzades:

**Glucosa:** determinació directa en sang utilitzant un sensor de glucosa (AccuTrend, Roche, Mannheim, Alemanya).

**Insulina:** determinació en plasma mitjançant ELISA (Mercodia, Uppsala, Suècia).



**Insulin-like growth factor I:** determinació en sèrum mitjançant ELISA (R&D, Minneapolis, EUA).

**Àcids grassos no esterificats (NEFA):** determinació en sèrum mitjançant un assaig colorimètric emprant el *kit* comercial NEFA C (ACS-ACOD method, Wako, Neuss, Alemanya).

## 4. IMMUNOHISTOQUÍMIQUES I ANÀLISIS MORFOMÈTRIQÜES

### 4.1. ANÀLISI MORFOMÈTRICA DEL TEIXIT ADIPÓS

Per als estudis histològics, les mostres de teixit adipós, una vegada extretes, es varen netejar amb PBS i pesar. A continuació, com es descriu en l'apartat 4.4, varen ser fixades, incloses en parafina i microseccionades. Per últim, aquestes seccions foren tenyides amb hematoxilina i eosina seguint el protocol detallat a l'apartat 4.5 i es mesurà l'àrea dels adipòcits en diversos camps de la preparació (500-600 adipòcits per mostra).

### 4.2. ANÀLISI MORFOMÈTRICA DEL PÀNCREES

Els pàncrees emprats pels estudis morfològics, una vegada extrets, es varen netejar amb PBS i pesar. A continuació, com es descriu en l'apartat 4.4, varen ser fixats, inclosos en parafina i microseccionats.

Per fer les diverses mesures morfològiques es varen emprar tres seccions de cada pàncrees, separades com a mínim per 300 µm (valor del diàmetre mitjà d'un illot de rata) per tal d'analitzar diferents zones del pàncrees i no mesurar els mateixos illots en seccions diferents. Amb aquestes seccions es va dur a terme una immunohistoquímica per insulina, emprant un anticòs secundari conjugat a peroxidasa, seguida d'una tinció topogràfica amb blau de toluïdina (vegeu l'apartat 4.5). El blau de toluïdina és un colorant metacromàtic que tenyeix diferencialment les cèl·lules, així es poden distingir els illots del teixit exocrí, ja que tot i que ambdós queden tenyits d'un color blau-lilós, els illots adopten un color més clar. Les àrees d'insulina, en canvi, es tenyeixen de color marró per l'activitat peroxidasa (vegeu la figura 13).

Aquestes preparacions es van analitzar mitjançant microscòpia de llum blanca mesurant les àrees totals de les seccions i les àrees tenyides per insulina d'aquestes. A partir d'aquestes mesures varem obtenir els següents paràmetres:

Percentatge d'àrea d'insulina en pàncrees: tant per cent de la suma de totes les àrees tenyides per insulina de les 3 seccions analitzades respecte a l'àrea total d'aquestes

seccions. Aquest paràmetre fou emprat com a mesura indirecte de la massa de cèl·lula beta (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2001; Kubota *et al.*, 2000; Terauchi *et al.*, 2007).

Nombre d'illots per àrea de pàncrees: nombre total d'illots comptabilitzats en les 3 seccions analitzades dividit per l'àrea total de les 3 seccions.

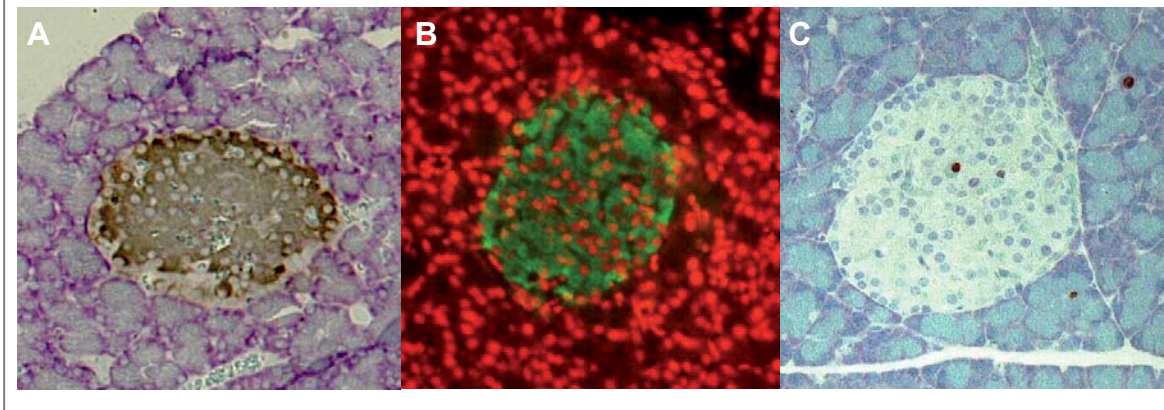
Distribució dels illots per la seva mida: com a mesura de l'àrea dels illots s'adoptà l'àrea tenyida per insulina d'aquests. En aquesta distribució no s'hi varen incloure les àrees de cèl·lules beta aïllades o clústers de menys de 5 cèl·lules beta (inferiors a les 500  $\mu\text{m}^2$ ), ja que es van considerar illots de nova formació (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2001; Jetton *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2006).

Una altra mesura morfològica que vàrem realitzar en pàncrees fou la de la mida de la cèl·lula beta. Per fer-ho, en una secció de cada pàncrees, es va dur a terme una immunofluorescència per insulina, emprant un anticòs secundari conjugat al fluorocrom Cy2, seguida d'una tinció de nuclis amb iodur de propidi (vegeu l'apartat 4.5). En les preparacions resultats, les àrees d'insulina mostraven fluorescència verda a causa del fluorocrom Cy2 i tots els nuclis apareixien en color vermell, ja que el iodur de propidi s'intercala en el DNA emetent fluorescència vermella (vegeu la figura 13). Aquestes preparacions foren analitzades mitjançant microscòpia de fluorescència i s'obtingué un valor promig de la mida de la cèl·lula beta dividint l'àrea tenyida per insulina (de com a mínim 30 illots) pel nombre de nuclis dins d'aquesta àrea.

### 4.3. MESURA DE LA PROLIFERACIÓ EN ILLOTS

La mesura de la proliferació en illots es va fer en els mateixos pàncrees inclosos en parafina emprats per a l'anàlisi morfològica. En una secció de cada pàncrees, es va realitzar una immunohistoquímica pel marcador de proliferació Ki67, revelant amb peroxidasa, seguida d'una tinció topogràfica amb blau de tolouïdina (vegeu l'apartat 4.5). Les preparacions es van analitzar mitjançant microscòpia de llum blanca, la tinció topogràfica amb blau de tolouïdina ens va permetre mesurar les àrees corresponents als illots, i la immunohistoquímica per Ki67, comptar els nuclis en proliferació d'aquestes àrees (vegeu la figura 13).

**FIGURA 13:** Seccions de pàncrees tenyides per insulina (revelatge amb peroxidasa, A, o immunofluorescència, B) i per Ki67 (revelatge amb peroxidasa),C.



#### 4.4. FIXACIÓ, INCLUSIÓ EN PARAFINA I MICROSECCIONAMENT DE TEIXITS

Les mostres de teixit foren fixades en formalina al 10% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 4 °C i durant tota la nit posterior a la seva extracció. A continuació, es van deshidratar i incloure en parafina seguint el següent protocol:

1. Fer un rentat amb PBS (Roche).
2. Fer 3 banys de 20 minuts cadascun, en una gradació ascendent d'etanols (Panreac, Castellar del Vallès, Espanya) al 50, 70, 90 i 100%, seguits de 3 banys més en xilol (Panreac).
3. Submergir en una solució de parafina fosa (Cymit química SL, Barcelona, Espanya) i xilol (1:1) i mantenir durant tota la nit a temperatura ambient.
4. Escalfar fins a la dissolució de la solució parafina-xilol (40 °C).
5. Substituir la solució de parafina-xilol per parafina fosa. Fer 3 banys de parafina fosa d'una hora cadascun, mantenint les mostres en una placa calenta a 60 °C.
6. Incloure en motlles amb parafina i deixar solidificar.

Els blocs amb les mostres incloses en parafina es varen conservar a temperatura ambient fins al moment de la seva utilització. Un dia abans de realitzar les immunohistoquímiques o les tincions, es varen tallar amb un micròtom (Leica Instruments, Nussloch, Alemanya) obtenint seccions de 10 µm de gruix, en el cas de les mostres de teixit adipós, o de 4 µm en les de pàncrees. Aquestes seccions es fixaren en portes polilisinats (Sigma-Aldrich) i es deixaren tota una nit assecant-se sobre el porta en una estufa a 37 °C.

## 4.5. TINCIONS I IMMUNOHISTOQUÍMIQUES

Tots els procediments s'iniciaren sometent les seccions a un procés de desparafinat i rehidratació. Per dur-lo a terme es van fer 2 banys de 15 minuts en xilol i 4 banys de 5 minuts en una gradació descendent d'etanols (100, 95, 70 i 50%). A continuació es realitzaren 2 rentats, un en aigua destil·lada de 3 minuts i un en PBS de 5 minuts, i es continuà amb el protocol específic de la tinció o la immunohistoquímica. Els procediments per a cada tinció o immunohistoquímica s'indiquen tot seguit:

### Immunohistoquímica d'insulina amb anticòs secundari conjugat a peroxidasa i tinció topogràfica amb blau de tolouïdina

1. PERMEABILITZACIÓ: submergir en PBS - 0,2% Tritó X-100 (Sigma-Aldrich), durant 20 minuts.
2. Fer dos rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.
3. BLOQUEIG DE LA PEROXIDASA ENDÒGENA: submergir en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durant 3 minuts.
4. Rentar amb PBS durant 5 minuts.
5. BLOQUEIG DE LES UNIONS INESPECÍFIQUES: submergir en PBS - 0,2% BSA (Sigma-Aldrich) durant 30 minuts.
6. INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS PRIMARI: incubar amb l'anticòs antiinsulina (Dako, Glostrup, Dinamarca) diluït 1/100 en PBS - 0,1% BSA tota la nit a 4 °C o 2 hores a temperatura ambient i en una cambra humida.
7. Fer dos rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.
8. INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS SECUNDARI: incubar amb l'anticòs *anti-guinea pig* conjugat a peroxidasa (Sigma-Aldrich) diluït 1/100 en PBS - 0,1% BSA, durant 30 minuts, a temperatura ambient i en una cambra humida.
9. Fer dos rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.
10. REVELATGE DE LA PEROXIDASA: incubar 30 segons en solució AEC Chromogen Kit (Sigma-Aldrich) controlant el revelatge sota microscopi.
11. Fer dos rentats amb aigua de l'aixeta de 5 minuts cadascun.
12. TINCIÓ TOPOGRÀFICA AMB BLAU DE TOLOUÏDINA: submergir en blau de tolouïdina (Serva, Heidelberg, Alemanya) al 3% de 20 segons i rentar amb aigua de l'aixeta durant uns 5 minuts.
13. Muntar amb medi de muntatge per a mostres hidratades Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA).

Immunohistoquímica de Ki67 amb anticòs secundari conjugat a peroxidasa i tinció topogràfica amb blau de tolouïdina

1. DESEMMASCARAMENT: escalfar en tampó citrat (Fluka, Buchs, Suïssa) (10 mM, pH=6) al microones a 450 W durant 5 minuts, deixar refredar i tornar a escalfar durant 3 minuts més. Deixar refredar a temperatura ambient durant 20 minuts.
2. Rentar amb aigua destil·lada durant 5 minuts.
3. BLOQUEIG DE LA PEROXIDASA ENDÒGENA: submergir en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durant 3 minuts.
4. Rentar amb PBS durant 5 minuts.
5. PERMEABILITZACIÓ: submergir en PBS-1% Tritó durant 30 minuts.
6. Fer dos rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.
7. BLOQUEIG DE LES UNIONS INESPECÍFIQUES: submergir en PBS-0,2% BSA 30 minuts.
8. INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS PRIMARI: incubar amb l'anticòs anti-Ki67 (Dako) diluït 1/25 en PBS -0,1% BSA - 0,1% Tritó tota la nit a 4 °C i en una cambra humida.
9. Rentar amb PBS, PBS - 0,2% Tritó i PBS durant 5 minuts.
10. INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS SECUNDARI: incubar amb l'anticòs secundari *anti-mouse* biotinilat (Sigma-Aldrich) diluït 1/200 en PBS - 0,1% BSA - 0,1% Tritó durant 1 hora a temperatura ambient i en una cambra humida.
11. Rentar amb PBS, PBS - 0,2% Tritó i PBS durant 5 minuts.
12. INCUBACIÓ AMB ESTREPTAVIDINA: incubar amb estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich) diluïda 1/20 en PBS - 0,1% BSA - 0,1% Tritó durant 1 hora a temperatura ambient i en cambra humida.
13. Fer dos rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.
14. REVELATGE DE LA PEROXIDASA: incubar 15 minuts en solució AEC Chromogen Kit controlant el revelatge sota microscopi.
15. Fer dos rentats amb aigua de l'aixeta de 5 minuts cadascun.
16. TINCIÓ TOPOGRÀFICA AMB BLAU DE TOLOUÏDINA: submergir en blau de tolouïdina al 3% durant 20 segons i rentar amb aigua de l'aixeta uns 5 minuts.
17. Muntar amb medi de muntatge per a mostres hidratades Mowiol (Calbiochem).

### Immunofluorescència d'insulina

1. PERMEABILITZACIÓ: submergir en PBS - 0,2% Tritó durant 20 minuts.
2. Fer dos rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.
3. BLOQUEIG DE LES UNIONS INESPECÍFIQUES: submergir en PBS - 0,2% BSA durant 30 minuts.
4. INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS PRIMARI: incubar amb l'anticòs primari antiinsulina diluït 1/100 en PBS - 0,1% BSA tota la nit a 4 °C o 2 hores a temperatura ambient i en una cambra humida.
5. Fer dos rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.
6. INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS SECUNDARI: incubar amb l'anticòs secundari *anti-guinea pig* conjugat a CY2 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Regne Unit) diluït 1/75 en PBS - 0,1% BSA, durant 30 minuts, a temperatura ambient i en una cambra humida.
7. Fer dos rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.
8. TINCIÓ NUCLEAR AMB IODUR DE PROPIDI: incubar amb una barreja de iodur de propidi (Sigma-Aldrich) a 10 µg/ml i RNAasa (Sigma-Aldrich) a 100 µg/ml durant 10 minuts a 37 °C protegint de la llum. El tractament amb RNAasa es realitza per obtenir una imatge més clara dels nuclis.
9. Fer dos rentats amb PBS de 10 minuts cadascun.
10. Muntar amb medi de muntatge per a mostres hidratades Mowiol (Calbiochem).

### Tinció amb hematoxilina-eosina

1. Submergir en solució d'hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich) durant 15 minuts.
2. Rentar amb aigua de l'aixeta durant 15 minuts.
3. Submergir en solució d'eosina (Sigma-Aldrich) durant 1 minut.
4. Deshidratar fent 5 banys de 3 minuts cadascun, en una gradació ascendent d'etanols (50, 70, 90, 100%) i xilol.
5. Muntar amb medi de muntatge per a mostres deshidratades Pertex (Histolab, Gothenburg, Suècia).

## **4.6. ANÀLISI D'IMATGES**

Les preparacions es varen analitzar emprant un microscopi connectat a un sistema de digitalització i processament d'imatges, Leica DMR (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanya).

## 5. CULTIUS CEL·LULARS

### 5.1. PROCEDIMENTS GENERALS

Tots els cultius cel·lulars foren cultivats sobre superfícies de plàstic i en un incubador en les següents condicions ambientals: 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> i 95% d'humitat relativa. La seva manipulació sempre es va fer en condicions estèrils, en una campana de flux laminar, i utilitzant reactius i materials estèrils.

En els cas de la línia cel·lular INS1E, es tripsinitzaren els cultius en arribar a confluència i se'n criopreservà una part per tal de garantir-ne el manteniment. Els procediments de tripsinització i criopreservació es detallen a continuació:

#### Tripsinització cel·lular

1. Aspirar el medi de cultiu i fer un rentat de les cèl·lules amb PBS.
2. Afegir al cultiu tripsina/EDTA (GibcoBRL, Gathersburg, MD, EUA) (només el volum necessari per cobrir les cèl·lules) i mantenir el flascó a l'incubador fins que les cèl·lules es comencin a desenganxar de la superfície de plàstic. Cal anar controlant el procés sota microscopi i per facilitar-lo es pot sacsejar el flascó amb compte.
3. Aturar la reacció de tripsinització afegint PBS i centrifugar la mostra a 1.500 rpm durant 3 minuts.
4. Descartar el sobrenedant i ressuspendre les cèl·lules amb medi de cultiu.
5. Mesclar 10 µl de cèl·lules amb 90 µl de blau tripà (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). El blau tripà permet valorar la viabilitat cel·lular, ja que només tenyeix les cèl·lules mortes.
6. Omplir una cambra de Neubauer (Hycor Biomedical, Kessel, Regne Unit) amb 10 µl de la mescla anterior i comptar el nombre de cèl·lules en el microscopi.
7. Posar a cultivar les cèl·lules tripsinitzades diluint-les en el volum de medi adequat segons el resultat del comptatge.

#### Criopreservació

1. Després de tripsinitzar i comptar les cèl·lules, centrifugar-les a 1.000 rpm 3 minuts.
2. Ressuspendre-les en FBS (GibcoBRL) amb un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich).
3. Repartir el volum en criotubs fent alíquotes de  $1 \times 10^6$  cèl·lules.
4. Congelar els criotubs a -80 °C envoltant-los de paper o d'alguna superfície aïllant per tal que la congelació tingui lloc lentament.

## 5.2. CULTIU DE CÈL·LULES INS1E

Les cèl·lules INS1E són un subclon de línia tumoral de cèl·lula beta de rata INS1. Aquestes, tot i que tenen un índex mitòtic superior al de les cèl·lules primàries, mostren un fenotip de cèl·lula beta ben diferenciat que es manté estable al llarg d'un nombre elevat de passatges (40-100) (Merglen *et al.*, 2004).

Tots els experiments de la present tesi foren realitzats amb cèl·lules INS1E entre els passatges 40 i 100. Per al seu manteniment, aquestes varen ser cultivades en flascons de 75 cm<sup>2</sup> amb el medi de cultiu que s'indica en la taula adjunta, el qual es renovava cada 2 dies. La seva tripsinització es duia a terme quan aquestes arribaven a confluència, aproximadament una vegada per setmana.

<b>MEDI DE CULTIU DE LES CÈL·LULES INS1E</b>	
Medi RPM1-1640 sense glucosa ni glutamina (Cambrex) i suplementat amb:	
Penicil·lina / estreptomicina (Cambrex)	100 U/ml
L-glutamina (Cambrex)	2 mM
D-glucosa (Merk)	11,1 mM
<i>Fetal bovine serum</i> (FBS) (GibcoBRL)	10%
HEPES (Cambrex)	10 mM
Piruvat sòdic (Cambrex)	1 mM
2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)	50 µM

## 5.3. AÏLLAMENT I CULTIU D'ILLOTS PANCREÀTICS DE RATA

### Aïllament d'illots pancreàtics de rata.

El procediment que emprarem per aïllar els illots pancreàtics és el que trobem descrit en (Gotoh *et al.*, 1987) amb algunes modificacions. A partir d'aquest es possible obtenir una preparació amb un elevat contingut d'illots i una baixa contaminació per teixit exocrí (la puresa del material obtingut és superior al 90% i el rendiment de 250-400 illots per pàncrees). El mètode consisteix a realitzar una digestió del pàncrees obtenint un homogenat, del qual es purifiquen els illots mitjançant un gradient de densitat discontinu, tal com es descriu a continuació:



## Material i mètodes

1. Una vegada sacrificat l'animal per decapitació, obrir-ne la cavitat abdominal, localitzar el colèdoc (desembocadura duodenal del conducte pancreàtic) i obstruir-lo amb unes pinces hemostàtiques en el seu punt d'unió a l'intestí prim.
2. Introduir una cànula en la part proximal del colèdoc, la més propera al fetge, i injectar-hi lentament 20 ml d'una solució de col·lagenasa P (Roche) a 1 mg/ml en HBSS (Sigma-Aldrich), de manera que el pàncrees es vagi distenent a poc a poc.
3. Extreure el pàncrees i passar-lo a un pot estèril amb 5 ml de la mateixa solució de col·lagenasa. Mantenir-lo en gel fins que es continuï processant al laboratori.
4. Posar a digerir el pàncrees amb la solució de col·lagenasa en un bany a 37 °C, durant 20 minuts i en agitació suau.
5. Acabar de digerir el teixit de manera mecànica amb una pipeta Pasteur de plàstic fins a obtenir una preparació homogènia.
6. Aturar la digestió afegint HBSS/BSA fred (1 mg BSA / ml) i deixar sedimentar durant 5 minuts. Aspirar el sobrenedant i tornar a repetir aquest pas.
7. Passar el teixit digerit per una agulla de 14G per acabar d'homogeneïtzar-lo i transferir-lo a un tub de 50 ml passant-lo a través d'un colador per eliminar els bocins de teixit no digerit.
8. Afegir HBSS/BSA fred i centrifugar durant 5 minuts a 1.000 rpm i 4 °C.
9. Descartar el sobrenedant i ressuspendre el sediment amb 10 ml d'Histopaque de densitat 1,119 g/l (Sigma-Aldrich) homogeneïtzant-lo amb una agulla de 14 G. A continuació afegir-hi suaument, en primer lloc 10 ml més d'Histopaque de densitat 1,077 g/l (Sigma-Aldrich) i després, 10 ml de HBSS/BSA.
10. Centrifugar durant 20 minuts a 1.000 g i 11 °C.
11. Amb una pipeta Pasteur de plàstic recollir els illots, els quals estan situats al voltant de la interfície entre el HBSS/BSA i l'Histopaque 1,077, i passar-los a un altre tub amb HBSS fred.
12. Centrifugar durant 5 minuts a 1.000 rpm i 4 °C. Descartar el sobrenedant i ressuspendre en HBSS fred.
13. Pescar els illots manualment amb una pipeta i sota una lupa binocular.

### Cultiu d'illots pancreàtics de rata.

Els illots foren cultivats en plaques de Petri no adherents. Després de la seva purificació i abans d'iniciar els diferents experiments, es varen incubar tota una nit amb el medi que s'indica en la taula adjunta, per tal que es recuperessin funcionalment i evitar així la variabilitat entre preparacions d'illots procedents de purificacions diferents.

<b>MEDI DE CULTIU D'ILLOTS PANCREÀTICS</b>	
Medi RPM1-1640 sense glucosa ni glutamina (Cambrex) i suplementat amb:	
Penicil·lina / estreptomina (Cambrex)	100 U/ml
L-glutamina (Cambrex)	2 mM
D-glucosa (Merk)	5,5 mM
<i>Fetal bovine serum</i> (FBS) (GibcoBRL)	10%

## 6. OBTENCIÓ DE MEDI CONDICIONAT DE TEIXIT ADIPÓS

Els medis condicionats es varen obtenir incubant, durant 4 hores, teixit adipós de diferent procedència (dels dipòsits pancreàtic mesentèric, epididimari i inguinal subcutani de rates obeses o controls) amb el medi que s'indica en la taula adjunta. Tot el material de dissecció que es va utilitzar havia estat esterilitzat prèviament i el processament del teixit en el laboratori es va fer en condicions estèrils sota una campana de flux laminar. El procediment emprat es detalla a continuació:

1. Extreure i pesar el teixit.
2. Disseccionar el teixit per extreure vasos i restes de teixits no adiposos i rentar-lo amb PBS.
3. Esmicolar el teixit en bocins molt petits (2 mm<sup>2</sup>), posar-lo en un tub de 50 ml amb PBS i seguir processant-lo al laboratori el més ràpidament possible.
4. Posar tot el teixit a sobre d'un filtre de niló de 70 µm (Cell Strainer, BD Biosciences, Bedford, MA, USA) i rentar-lo amb 50 ml de PBS.
5. Passar el teixit a una placa de Petri amb el medi de cultiu (5 ml / g de teixit) i deixar-lo en l'incubador a 37 °C durant 4 hores.
6. Separar el teixit del medi, filtrar el medi amb un filtre esterilitzant de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA, EUA) i congelar-lo a -80 °C.

<b>COMPOSICIÓ DEL MEDI CONDICIONAT DE TEIXIT ADIPÓS</b>	
Medi RPM1-1640 sense glucosa ni glutamina (Cambrex) i suplementat amb:	
Penicil·lina / estreptomina (Cambrex)	100 U/ml
L-glutamina (Cambrex)	2 mM
D-glucosa (Merk)	11,1 mM
BSA (Sigma-Aldrich)	0,2%

## 7. ASSAIGS DE PROLIFERACIÓ

### 7.1. ESTUDI DE PROLIFERACIÓ EN CÈL·LULES INS1E

Per tal d'estudiar les propietats mitòtiques dels medis condicionats de teixit adipós, és quantificà la proliferació que aquests induïen en la línia cel·lular INS1E. Per a aquesta quantificació s'emprà el mètode d'incorporació de timidina tritiada (timidina-<sup>3</sup>H), la qual s'incorpora al DNA de les cèl·lules que s'estan replicant, seguint el protocol següent:

1. En un placa de 96 pouets de fons rodó, plantar  $36 \times 10^3$  cèl·lules INS1E per pou en un volum final de 200  $\mu$ l de medi de manteniment de cèl·lules INS1E (vegeu l'apartat 5.2). Deixar-les en cultiu durant 48 hores.
2. Canviar el medi de manteniment pel de deprivació <sup>a</sup> i deixar incubar durant una nit.
3. Treure el medi de deprivació i deixar les cèl·lules en cultiu durant 20 hores amb els diferents medis per testar <sup>b</sup>.
4. Afegir al medi timidina-<sup>3</sup>H (Amersham, Buckinghamshire, Regne Unit) a una concentració final de 10  $\mu$ Ci / ml i després de 4 hores en cultiu congelar la placa a  $-20$  °C.
5. Deixar descongelar la placa durant 2 hores a 37 °C i aspirar les cèl·lules mitjançant l'equip Cell-Harvester (Wallac, Finlàndia) recollint-les en un filtre (Printed Filtermat, Wallac).
6. Comptar l'emissió  $\beta$  del <sup>3</sup>H incorporat en les cèl·lules i recollit en el filtre mitjançant un comptador de centelleig de radiació  $\beta$  (Beta Plate, Wallac).

<sup>a</sup> **Medi de deprivació:** medi amb la mateixa composició que el medi de manteniment de les cèl·lules INS1E (vegeu l'apartat 5.2), però amb una concentració de glucosa de 5,5 mM i BSA al 0,1% en substitució de l'FBS.

<sup>b</sup> **Medis per testar:** medis compostos pels medis condicionats de teixit adipós (vegeu l'apartat 6) diluïts 1/3 en medi RPMI amb els reactius necessaris per tal d'obtenir una composició final igual a la del medi de manteniment de les INS1E (vegeu l'apartat 5.2), variant la concentració de glucosa segons cada experiment (5,5 mM o 15 mM) i substituint l'FBS per BSA al 0,1%. En alguns experiments, per comprovar la implicació de la proteïna Igfbp3 en els efectes observats, també vàrem afegir al medi un anticòs contra Igfbp3 de rata (Upstate, Temecula, CA, EUA) a 0,001  $\mu$ g/ml o la proteïna Igfbp3 recombinant (R&D systems, Minneapolis, EUA) a 10 nM o 50 nM. També vàrem comprovar l'efecte de la desactivació del medi condicionat escalfant-lo a 65 °C durant 10 minuts.

## 7.2. ESTUDI DE LA PROLIFERACIÓ EN ILLOTS

Per quantificar la proliferació induïda en illots pel medi condicionat de teixit adipós, també vàrem emprar el mètode d'incorporació de timidina-<sup>3</sup>H, seguint els passos següents:

1. Una vegada aïllats, deixar en cultiu els illots tota una nit amb el medi de recuperació d'illots (vegeu l'apartat 5.3).
2. Rentar els illots amb HBSS i posar-los a cultivar amb els medis per testar <sup>a</sup>.
3. Transcorregudes 24 hores, afegir hidroxiiurea (Sigma-Aldrich) al medi de cultiu a una concentració final de 12,5 mM. La hidroxiiurea ajuda a sincronitzar el cultiu, ja que atura les cèl·lules en la fase G1 del cicle cel·lular.
4. Després de romandre 24 hores en cultiu amb la hidroxiiurea, rentar els illots 5 vegades amb HBSS i tornar-los a deixar cultivant amb els medis per testar.
5. Transcorregudes 3 hores, afegir al medi de cultiu timidina-<sup>3</sup>H a una concentració final de 10 µCi / ml.
6. Després d'una hora amb timidina-<sup>3</sup>H, pescar els illots, col·locar-los en una altra placa amb HBSS i amb l'ajuda d'una lupa binocular, comptar el nombre exacte d'illots recuperats.
7. Tornar a pescar els illots i col·locar-los en un tub eppendorf amb 1 ml de HBSS.
8. Centrifugar els illots durant 5 minuts a 1.000 rpm i 4 °C. Descartar el sobrenedant i congelar els illots com a precipitat sec a -80 °C.
9. Ressuspendre els illots en 300 µl d'aigua destil·lada i sonicar-los 5 vegades a una potència de 10 W i durant 10 segons.
10. Afegir 3 ml d'àcid tricloràcetic (Sigma-Aldrich) fred al 50% i al·lquotar en tres tubs cada mostra.
11. Filtrar cada alíquota a través d'un filtre de 25 µm de diàmetre (Glass microfibre filters, Whatman®, Maidstone, Regne Unit) mitjançant el *Sampling Manifold* (Millipore) i una bomba de buit.
12. Rentar tres vegades el filtre amb aigua destil·lada, recollir-lo i col·locar-lo en un vial amb 10 ml de líquid de centelleig (Optiphase Hisafe3, Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA). Comptar l'emissió β del <sup>3</sup>H incorporat en un comptador TRI-CARB 2300 TR (Packcard Instruments, Meriden, CT, USA).

<sup>a</sup> **Medis per testar:** medis compostos pels medis condicionats de teixit adipós (apartat 6) diluïts 1/3 en medi RPMI amb els reactius necessaris per tal d'obtenir una composició final igual a la del medi de recuperació d'illots (apartat 5.3), però reduint la concentració d'FBS al 2%.

## 8. EXTRACCIÓ D'RNA I TRANSCRIPCIÓ REVERSA

La purificació i la manipulació de l'RNA requereix certes precaucions que cal tenir presents. La principal font de degradació de l'RNA és la contaminació per ribonucleases (RNAses), enzims molt actius i estables que poden generar importants problemes per a l'òptima integritat de l'RNA. Per tant, és necessari treballar amb guants per evitar el contacte directe amb la pell, principal font de contaminació per RNAses. A més, cal treballar amb reactius i material d'ús específic lliures d'RNAses.

### 8.1. SEPARACIÓ DE LES FRACCIONS ADIPOCITÀRIA I ESTROMAL DEL TEIXIT ADIPÓS

Per certs experiments, l'RNA emprat fou de teixit adipós total però en d'altres també s'analitzà l'RNA de les seves fraccions estromal i adipocitària per separat. A continuació es detalla el protocol, previ a l'extracció d'RNA, mitjançant el qual se separaren aquestes dues fraccions:

1. Extreure el teixit adipós, pesar-lo i mantenir-lo en PBS fins al seu posterior processament al laboratori.
2. Homogeneïtzar el teixit i posar-lo a digerir amb 10 ml de tampó de digestió <sup>a</sup> per cada gram de teixit, en un bany a 37 °C, durant 30 minuts i en agitació.
3. Després d'inhibir la col·lagenasa afegint 5 ml de medi DMEM F12 (GibcoBRL) complementat amb un 10% d'NCS (GibcoBRL), passar l'homogenat per un filtre de niló (amb un diàmetre de porus de 25 µm) per descartar les restes de teixit adipós no digerides.
4. Centrifugar l'homogenat a 1.600 rpm, durant 10 minuts i a temperatura ambient.
5. Aspirar els adipòcits que es troben flotant en la fase superior i recuperar la fracció vascular-estromal situada en el sediment. Aliquotar les dues fraccions i conservar-les a -80 °C fins a extreure l'RNA de les mateixes.

<sup>a</sup> **Tampó de digestió:** 2 mg/ml de col·lagenasa (Sigma-Aldrich) i un 2% de BSA en medi DMEM F-12 (GibcoBRL, Gathersburg, MD, EUA).

## 8.2. OBTENCIÓ D'RNA DE TEIXIT ADIPÓS BLANC TOTAL O DE LES SEVES FRACCIONS ADIPOCITÀRIA I ESTROMAL

En el cas del teixit adipós total o dels adipòcits aïllats, varem emprar un *kit* comercial específic per a l'extracció d'RNA de mostres amb un elevat contingut lipídic, *kit* MINI RNeasy Lipid Tissue de QIAGEN (Hilden, Alemanya). Tant el teixit adipós total com els adipòcits s'havien congelat en nitrogen líquid immediatament després de la seva extracció i s'havien mantingut a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  fins a ser emprats. El protocol seguit per a l'extracció d'RNA fou el següent, indicat pel fabricant del *kit*:

1. Pesar la quantitat necessària de mostra de la qual partim, aproximadament 300 mg.
2. Afegir 3 ml de Qiazol i homogeneïtzar amb un politró (T8-10, Ika-Labortechnik, Staufen, Alemanya) mantenint la mostra en gel (en el cas dels adipòcits, no es requereix l'homogeneïtzació amb el politró).
3. Homogeneïtzar amb una xeringa d'insulina d'1 ml passant tot el volum per la xeringa 5 vegades.
4. Deixar a temperatura ambient durant 5 minuts.
5. Afegir 600  $\mu\text{l}$  de cloroform (Fluka) i agitar vigorosament durant 15 segons.
6. Deixar a temperatura ambient durant 2 o 3 minuts.
7. Centrifugar durant 15 minuts a 12.000 g i  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
8. Traspasar la fase aquosa superior a un altre tub, afegir-hi 1 volum (2 ml) d'etanol al 70% i vortejar.
9. Pipetejar 700  $\mu\text{l}$  de la mostra a una columna del *kit*, centrifugar a 10.000 rpm durant 15 segons a temperatura ambient i descartar l'eluat. Repetir aquest pas fins a passar per la columna tota la mostra.
10. Pipetejar 350  $\mu\text{l}$  del tampó RW1 a la columna, centrifugar a 10.000 rpm durant 15 segons a temperatura ambient i descartar l'eluat.
11. Mesclar 280  $\mu\text{l}$  de tampó RDD amb 40  $\mu\text{l}$  de DNAsa I.
12. Pipetejar 80  $\mu\text{l}$  de la mescla anterior al centre de cada columna i deixar a temperatura ambient durant 15 minuts.
13. Pipetejar 350  $\mu\text{l}$  del tampó RW1 a la columna, centrifugar a 10.000 rpm durant 15 segons a temperatura ambient i descartar l'eluat.
14. Transferir la columna a un nou tub de recollida. Pipetejar 500  $\mu\text{l}$  del tampó RPE a la columna, centrifugar a 10.000 rpm durant 15 segons a temperatura ambient i descartar l'eluat.
15. Afegir 500  $\mu\text{l}$  més del tampó RPE a la columna, centrifugar a 10.000 rpm durant 2

## Material i mètodes

minuts a temperatura ambient i descartar l'eluat.

16. Transferir la columna a un nou tub de recollida i centrifugar a màxima velocitat (13.000 rpm) durant 1 minut.
17. Per a eluir l'RNA, transferir la columna a un tub eppendorf de 1,5 µl, pipetejar al centre de la columna 30 µl d'H<sub>2</sub>O lliure d'RNAses, esperar 1 minut i centrifugar a 10.000 rpm durant 1 minut. Per concentrar més la mostra es pot tornar a repetir aquest pas passant l'eluat una altra vegada per la columna.
18. Una vegada extret, conservar l'RNA a -80 °C i per emprar-lo, descongelar-lo mantenint-lo en gel per evitar-ne la degradació.

Per a l'extracció de l'RNA de la fracció estromal del teixit adipós, es va emprar també un *kit* comercial de QIAGEN però en aquest cas, no específic per a mostres lipídiques (kit MINI RNeasy, QIAGEN, Hilden, Alemanya). El protocol del mateix s'indica a continuació:

1. Ressuspendre el sediment de cèl·lules estromals amb el volum necessari de tampó de RLT (600 µl de tampó / 20-30 mg de mostra).
2. Agitar vigorosament la mostra durant 30 segons i després homogeneïtzar-la amb una xeringa d'insulina d'1 ml. Fer passar la mostra per la xeringa 5 vegades.
3. Centrifugar el lisat a 13.000 rpm durant 3 minuts, traspasar el sobrenedant a un altre tub i descartar el precipitat.
4. Afegir 600 µl d'etanol al 70%, agitar manualment i amb la pipeta.
5. Pipetejar 700 µl de la mostra a una columna del *kit*, centrifugar a 10.000 rpm durant 15 segons a temperatura ambient i descartar l'eluat. Repetir aquest pas fins a passar per la columna tota la mostra.
6. Pipetejar 700 µl del tampó RW1 a la columna, centrifugar a 10.000 rpm durant 15 segons a temperatura ambient i descartar l'eluat.
7. Mesclar 280 µl de tampó RDD amb 40 µl de DNAsa I.
8. Pipetejar 80 µl de la mescla anterior al centre de cada columna i deixar a temperatura ambient durant 15 minuts.
9. Pipetejar 700 µl del tampó RW1 a la columna, centrifugar a 10.000 rpm durant 15 segons a temperatura ambient i descartar l'eluat.
10. Continuar amb els passos 14-18 explicats prèviament per a l'extracció d'RNA de teixit adipós total o adipòcits aïllats.

### 8.3. TRANSCRIPCIÓ REVERSA DE L'RNA

Per al posterior estudi de PCR quantitativa (vegeu l'apartat 10), era necessari fer una retrotranscripció de l'RNA prèvia. En aquest procés es generen còpies de cDNA emprant com a motlle les seqüències d'RNAm de la mostra. Aquestes còpies de cDNA, a la seva vegada, són emprades com a motlle en la PCR quantitativa. La retrotranscripció es va dur a terme mitjançant el *kit* comercial First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) i fent servir la transcriptasa inversa SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). El protocol que es va seguir fou el següent, detallat pel fabricant:

1. Preparar les mostres disposant en un tub eppendorf l'RNA i els reactius següents:

2 µg d'RNA total	x µl
Mescla de dNTP (10 mM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP)	1 µl
Encebadors (random hexamers 50 ng/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	fins a 13 µl

2. Incubar les mostres a 65 °C durant 5 minuts i immediatament després deixar-les en gel, almenys 1 minut.
3. Preparar la mescla de reacció i afegir-ne 7 µl a cadascuna de les mostres anteriors:

<b>MESCLA PER A CADA REACCIÓ</b>	
Tampó d'RT 5X	4 µl
DTT (100 mM)	1 µl
Inhibidor d'RNAses (40 U / µl)	1 µl
SuperScript III RT (200 U / µl)	1 µl

4. Incubar a 25 °C durant 5 minuts.
5. Incubar a 50 °C durant 50 minuts.
6. Finalitzar la reacció amb un pas de desactivació de l'enzim incubant a 70 °C, i ràpidament posar en gel.



## 8.4. QUANTIFICACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ I AVALUACIÓ DE LA PURESA DE L'RNA I EL cDNA

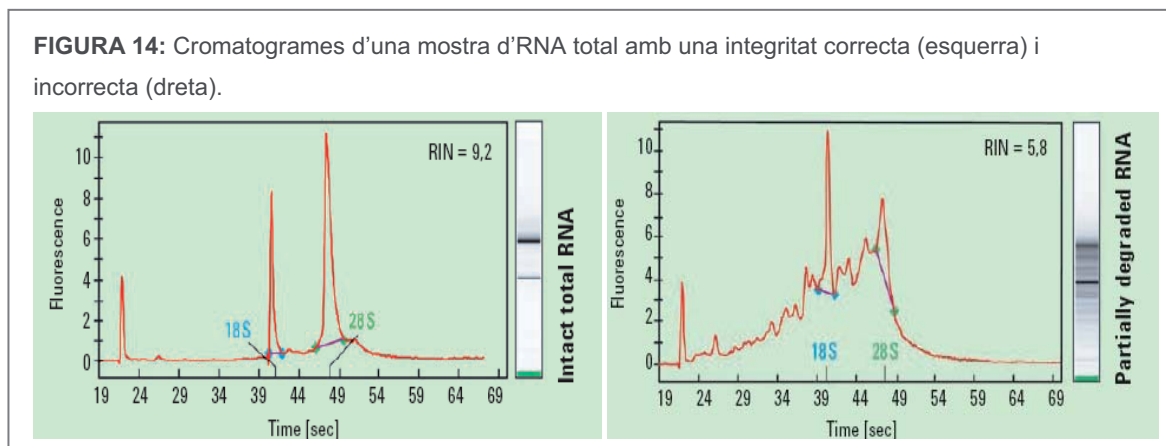
La concentració de l'RNA i el cDNA es va determinar mitjançant espectrofotometria, analitzant l'absorbància a 260 nm de longitud d'ona i tenint en compte que una unitat d'absorbància a aquesta longitud d'ona correspon a 40 mg/ml d'àcid nucleic de cadena senzilla (RNAm o cDNA).

La puresa de la preparació es va avaluar mesurant la relació entre l'absorbància a 260 nm i 280 nm de longitud d'ona. Es considera que la mostra presenta una puresa acceptable quan aquesta relació es troba entre 1,9 i 2,1.

## 8.5. COMPROVACIÓ DE LA QUALITAT DE L'RNA

Per a comprovar la integritat de l'RNA es varen utilitzar les targetes microfluidiques "Lab-on-a-chip" (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) que es varen analitzar en l'equip Bioanalyzer (Agilent Technologies) de la unitat de genòmica de l'Hospital Clínic de Barcelona. Aquestes targetes contenen unes microcolumnnes en les què s'hi carreguen de 25 a 500 ng/ $\mu$ l d'RNA, el qual és separat cromatogràficament pel seu pes molecular. Les microcolumnnes, a més, porten incorporat un fluoròfor que tenyeix l'RNA de manera que pot ser detectat per un fluoròmetre. Juntament amb les mostres també es carrega un marcador de pes molecular que permet saber el pes de les bandes obtingudes. Al final del procés s'obté un cromatograma que mostra els pics de fluorescència corresponents a les bandes d'RNA separades segons el seu pes molecular.

En la figura 14 es mostra un cromatograma típic d'una mostra d'RNA total amb una integritat correcta (cromatograma de l'esquerra), on apareixen 2 pics d'alta intensitat corresponents a l'RNA ribosòmic 18S i 28S (molt més abundants que la resta dels RNA). El fet que apareguin altres pics, com en el cromatograma de la dreta, és indicatiu que hi ha hagut degradació de l'RNA.



## 9. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER MICROARRAYS

Per a l'estudi de l'expressió gènica en teixit adipós peripancreàtic vàrem utilitzar la tecnologia dels microarrays. Els microarrays, de manera similar a altres tècniques com el Northern Blot o la PCR quantitativa, permeten la quantificació relativa de l'expressió gènica amb l'avantatge que es poden analitzar milers de gens a la vegada.

Els microarrays consisteixen en un suport sòlid sobre el qual han estat dipositades amb molta precisió milers de sondes d'oligonucleòtids coneguts. Cada sonda es troba en una determinada àrea del microarray anomenada cel·la (*cell probe*), que conté milions de còpies d'aquesta. L'abundància de cada transcrit es determina hibridant el microarray amb mostres d'RNA marcades amb un fluorocrom. La intensitat del senyal obtingut per a cada cel·la depèn del grau d'hibridació de les sondes d'aquesta cel·la amb el seu transcrit complementari i és directament proporcional a l'abundància d'aquest transcrit en la mostra d'RNA.

Els microarrays que vàrem emprar van ser els RAE230 2.0 de la casa comercial Affymetrix, que permeten analitzar l'expressió de 31042 gens de rata. Aquests microarrays porten incorporades 11 sondes diferents de 25 nucleòtids per a cada gen amb una seqüència coincident a la regió 3' del gen corresponent (les anomenades PerfectMatch, PM). A més, per a cadascuna d'aquestes sondes, també n'hi ha una d'identica, excepte en el nucleòtid 13 que permet valorar el soroll de fons degut a les unions inespecífiques (a aquestes se les anomena MisMatch, MM). El conjunt de les 22 sondes corresponents a un gen determinat s'anomena Probe Set. Els microarrays també contenen conjunts de Probe Sets de gens control per comprovar que la hibridació i la retrotranscripció han funcionat correctament.

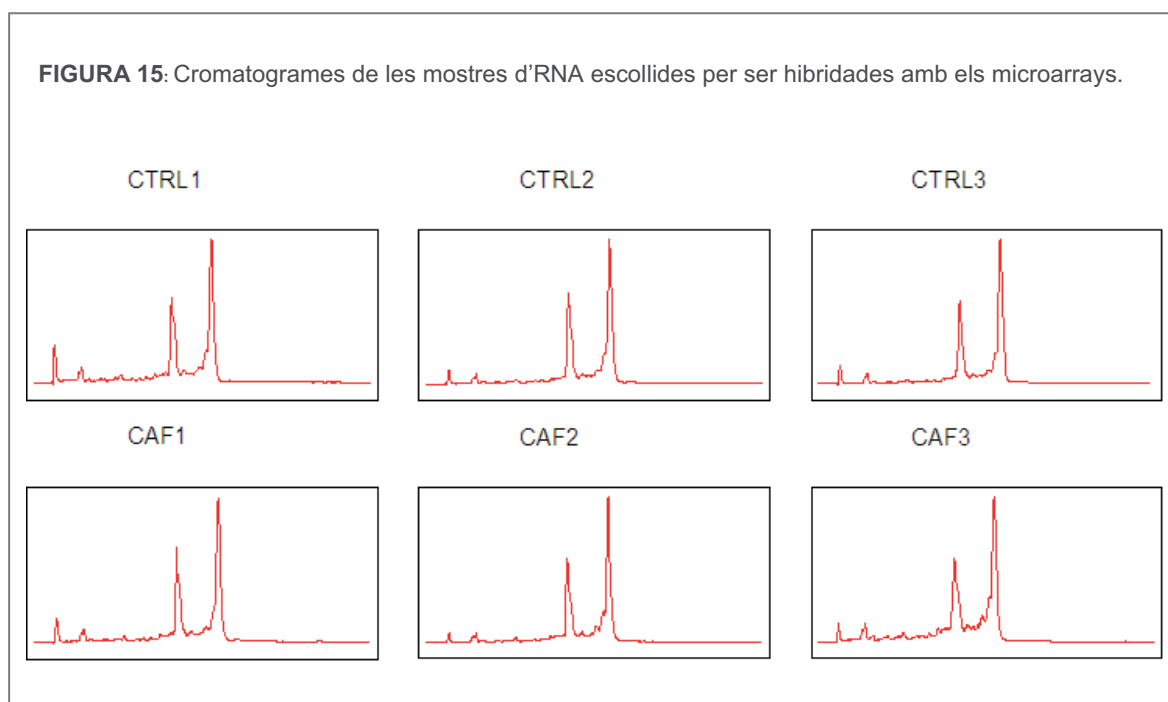
La seqüència de passos que vàrem seguir per dur a terme aquest estudi s'indica a continuació:

- A. PREPARACIÓ I SELECCIÓ DE LES MOSTRES D'RNA.
- B. AMPLIFICACIÓ, MARCATGE I HIBRIDACIÓ DE L'RNA.
- C. PROCESSAMENT I ANÀLISI ESTADÍSTICA DE LES DADES.
- D. CONTROL DE QUALITAT DELS MICROARRAYS.
- E. SELECCIÓ DE GENS QUE CODIFIQUEN PER A PROTEÏNES SECRETABLES I IMPLICADES EN PROCESSOS DE PROLIFERACIÓ.

## 9.1. PREPARACIÓ I SELECCIÓ DE LES MOSTRES D'RNA

Els RNA que es varen hibridar amb els microarrays procedien de teixit adipós total, del dipòsit pancreàtic mesentèric de 9 rates CTRL i 9 rates de CAF de 35 dies de dieta. Aquests RNA es varen extreure seguint el procediment detallat en l'apartat 8.2. Del total de mostres obtingudes se'n varen escollir 3 de cada grup per hibridar-les cadascuna amb un microarray. Foren escollits els RNA que presentaven una major puresa i integritat, i per tant, complien amb els requisits necessaris per poder ser hibridats amb els microarrays (vegeu la taula adjunta). En la figura 15 es mostren els cromatogrames obtinguts dels 6 RNA escollits per ser hibridats amb els microarrays.

<b>REQUISITS DELS RNA ESCOLLITS PER SER HIBRIDATS AMB ELS MICROARRAYS</b>			
<b>µg RNA</b>	<b>Concentració</b>	<b>Puresa</b>	<b>Integritat RNA</b>
2,5 µg	mínima 200 ng/µl	ratio entre 1,8 i 2	correcta

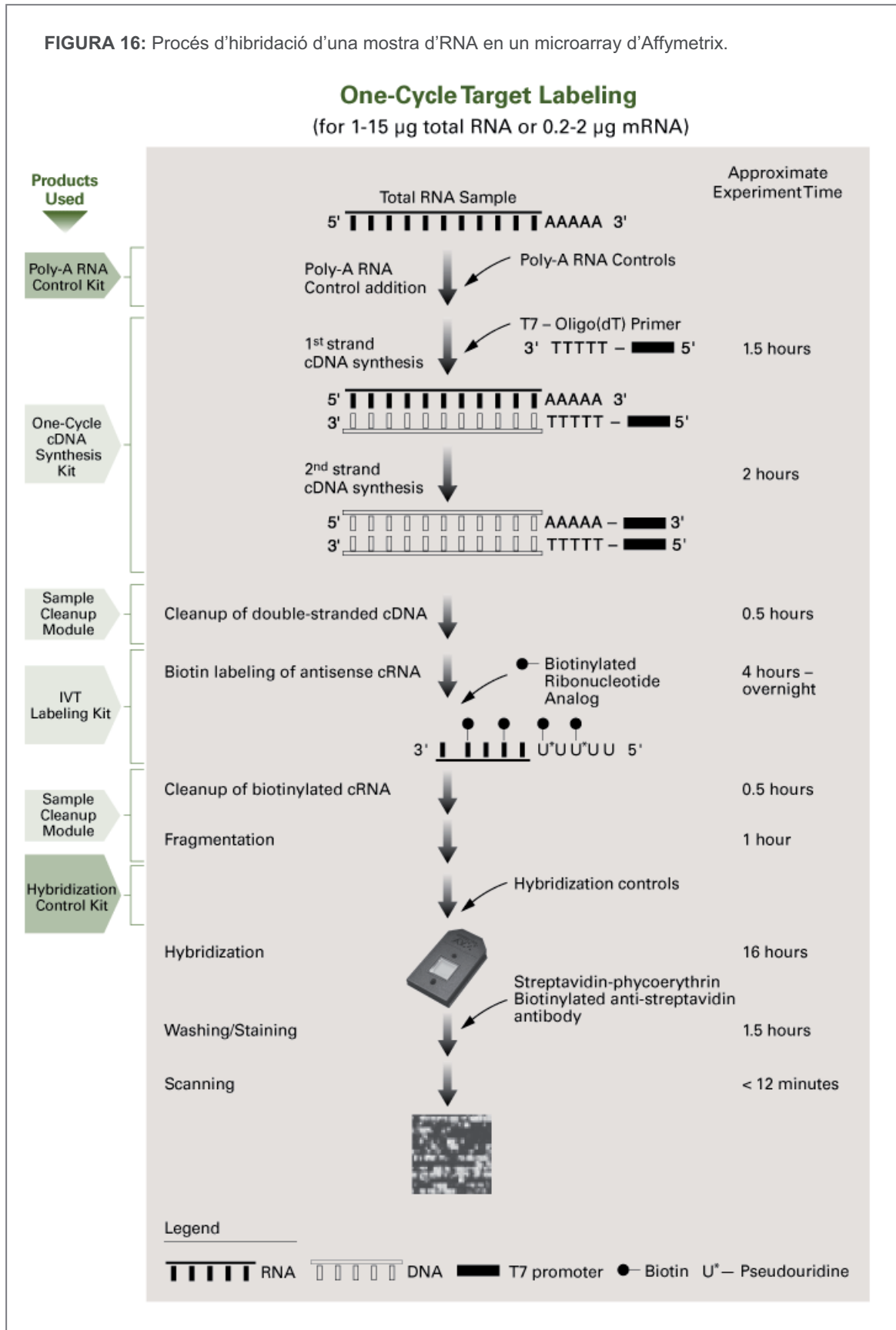


## 9.2. AMPLIFICACIÓ, MARCATGE I HIBRIDACIÓ DE L'RNA

El procés d'hibridació va ser dut a terme en la plataforma d'Affymetrix de la unitat de genòmica de l'Hospital Clínic de Barcelona. Abans de la hibridació, l'RNA ha de ser amplificat i marcat; en el nostre cas partíem d'una quantitat d'RNA de 2 µg, suficient per realitzar un sol cicle d'amplificació. El procediment emprat per a tot el procés d'amplificació, marcatge i hibridació fou l'establert per Affymetrix, consistent en els passos següents (vegeu la figura 16):

1. Incorporar a l'RNA de la mostra un seguit d'RNA controls (controls de retrotranscripció).
2. Retrotranscriure l'RNA total a cDNA. La major estabilitat del cDNA permet conservar-lo el temps necessari fins a la hibridació sense que es degradi.
3. Transcriure *in vitro* el cDNA a cRNA. Aquest cRNA queda marcat amb biotines ja que les uridines que s'hi incorporen en la seva síntesi estan conjugades a biotina.
4. Fragmentar el cRNA en peces de 30 a 400 parells de bases.
5. Incorporar a l'RNA fragmentat un seguit d'oligonucleòtids control marcats amb biotina (controls d'hibridació).
6. Hibridar l'RNA fragmentat i els oligonucleòtids control amb el microarray.
7. Després d'un procés de rentat per eliminar els fragments d'RNA no hibridats, tenyir el microarray mitjançant estreptavidina conjugada a un fluorocrom, la qual s'uneix a la biotina dels fragments d'RNA hibridats amb les sondes del microarray.
8. Després d'un segon procés de rentat, escanejar i quantificar el microarray. La quantificació es realitza mitjançant el programa Microarray Suite 5 (MAS5) d'Affymetrix, que dóna un valor d'intensitat de fluorescència a cada cel·la del microarray.

FIGURA 16: Procés d'hibridació d'una mostra d'RNA en un microarray d'Affymetrix.



### 9.3. PROCESSAMENT I ANÀLISI ESTADÍSTICA DE LES DADES

El processament de les dades crues dels microarrays obtingudes després de l'escaneig va consistir en corregir el soroll de fons, normalitzar les dades dels diferents microarrays i sintetitzar tots els valors d'intensitat de fluorescència de totes les sondes d'un mateix gen a un únic valor d'expressió gènica. Per fer-ho vàrem emprar l'algoritme RMA (Robust Multi-chip Average) (Bolstad *et al.*, 2003; Irizarry *et al.*, 2003a; Irizarry *et al.*, 2003b) mitjançant el paquet Affy (Gautier *et al.*, 2004) de l'entorn Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004), basat en el llenguatge de programació R (Ihaka i Gentleman, 1996; RDevelopmentCoreTeam, 2006). Com ja hem comentat anteriorment, cada gen està representat en el microarray per 11 sondes PerfectMatch (amb una seqüència totalment coincident a la del gen) i 11 sondes MisMatch (amb un dels nucleòtids no coincident). Actualment existeixen diferents algorismes que permeten sintetitzar els valors d'intensitat d'aquestes 22 sondes a un únic valor d'expressió del gen. En el cas de l'algoritme RMA, a diferència d'altres, no es té en compte les sondes MisMatch a l'hora d'obtenir el valor d'expressió ja que considera que no són del tot inespecífiques i per tant, no les utilitza per valorar el soroll de fons.

L'anàlisi estadística es va dur a terme mitjançant el programa SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher *et al.*, 2001). El programa SAM permet obtenir un determinat nombre de gens significatius per un cert llindar d'FDR (*False Discovery Rate*) (Benjamini i Hochberg, 1995), el qual indica el nombre màxim de falsos positius que admetem en la llista de gens estadísticament significatius que obtindrem. En el nostre cas, aquest llindar el fixàrem en un 5%. En l'anàlisi estadística només hi incloguérem, en primer lloc, els gens en els què la ràtio entre la seva expressió en rates de cafeteria i rates control ( $FC = \text{Fold Change}$ ) era superior a 1,5 o inferior a -1,5. En segon lloc, només vàrem tenir en compte els gens presents almenys en 2 microarrays d'un dels grups d'estudi i que no eren controls interns. Per determinar quins gens eren presents o absents en cada microarray, és a dir, expressats o no en cada mostra, es va emprar el programa Microarray Suite 5 (MAS5) d'Affymetrix (Liu *et al.*, 2002), el qual calcula la presència o absència de cada gen mitjançant l'algoritme MAS5.0 a partir del senyal obtingut de les seves sondes PerfectMatch o MisMatch.

Amb les dades d'expressió dels 6 microarrays realitzats també es va dur a terme una anàlisi de components principals (PCA) mitjançant el paquet informàtic Affycoretools.

La representació de l'expressió de cada gen en cada microarray en un *heat diagram* es realitzà mitjançant el programa dChip (Li i Wong, 2001).

## 9.4. CONTROLS DE QUALITAT

Prèviament a l'anàlisi estadística, les dades crues i processades dels microarrays foren sotmeses a un seguit de controls de qualitat per tal de descartar possibles variacions entre les mostres, d'origen tècnic i no biològic.

### Controls establerts per Affymetrix (AffymetrixInc)

Aquests controls es basen en l'anàlisi de les dades crues generades després de l'escaneig i la quantificació. Estan dissenyats per detectar possibles errors ocorreguts en els diferents passos d'amplificació, marcatge i hibridació de l'RNA. Alguns d'ells es basen en valors calculats a partir de l'algoritme MAS5.0, com són el percentatge de gens presents o absents i el factor de normalització i escalat. Es varen dur a terme mitjançant el paquet informàtic Affy i SimpleAffy (Wilson i Miller, 2005) de l'entorn Bioconductor.

A. INSPECCIÓ VISUAL. Es basa en l'observació de les imatges obtingudes de l'escaneig dels microarrays, aquestes cal que presentin un aspecte homogeni sense anomalies com rallades o zones de saturació.

Observant de manera general els microarrays realitzats, no s'hi va detectar cap anomalia important destacable.

B. OLIGOS B2. Els oligos B2 s'afegeixen a l'RNA fragmentat de la mostra abans de l'hibridació (vegeu el procediment descrit en l'apartat 9.2). Aquests, en hibridar-se amb les seves sondes complementàries, permeten la visualització del nom del microarray en la part superior esquerra d'aquest i també mostren una gradeta virtual per tots els marges del microarray que serveix per situar la resta de sondes.

La inspecció visual dels microarrays realitzats va permetre observar amb claredat els patrons dels marges i el nom del microarray (vegeu la figura 17).

FIGURA 17: Control d'OLIGOS B2.



C. MITJANA DEL SOROLL DE FONTS. El soroll de fons cal que sigui homogeni entre les diferents mostres per descartar problemes tècnics com ara una diferent eficiència de la hibridació o d'alguna de les reaccions prèvies, la qual cosa comportaria una major quantitat de cRNA marcat i, per tant, un major senyal.

El soroll de fons mitjà, calculat pel propi *software* de l'estació d'Affymetrix, fou homogeni entre els diferents microarrays, concretament, s'obtingué un valor mitjà de 47,88 amb un rang de 44,84 a 53,98 (vegeu la figura 18).

D. PERCENTATGE DE GENS PRESENTS. La presència o absència d'un gen es calcula a partir del senyal obtingut de les seves sondes PerfectMatch o MissMatch. Aquest control estableix que el percentatge de gens presents o absents cal que sigui similar entre els diferents microarrays, i que la variabilitat entre ells no superi el 10%.

En el cas dels nostres microarrays, la mitjana del percentatge de gens presents fou del 61,98% amb un rang de 59,8% a 64,68% (vegeu la figura 18). Per tant, aquest control de qualitat també fou superat satisfactòriament pels microarrays realitzats.

E. FACTOR DE NORMALITZACIÓ I ESCALAT. En la majoria d'experiments, existeix un nombre molt petit de transcrits que presenten canvis entre les diferents mostres. Aquest fet fa que els diferents microarrays puguin ser normalitzats de manera que s'obtingui una mateixa intensitat mitjana per a tots ells i que només els canvis observats després d'aquesta normalització siguin atribuïbles a diferències biològiques i no tècniques. Per descartar aquestes diferències d'origen tècnic, Affymetrix estableix que el màxim dels valors d'escalat que s'apliquen per normalitzar cadascun dels microarrays no ha de superar el triple del valor mínim.

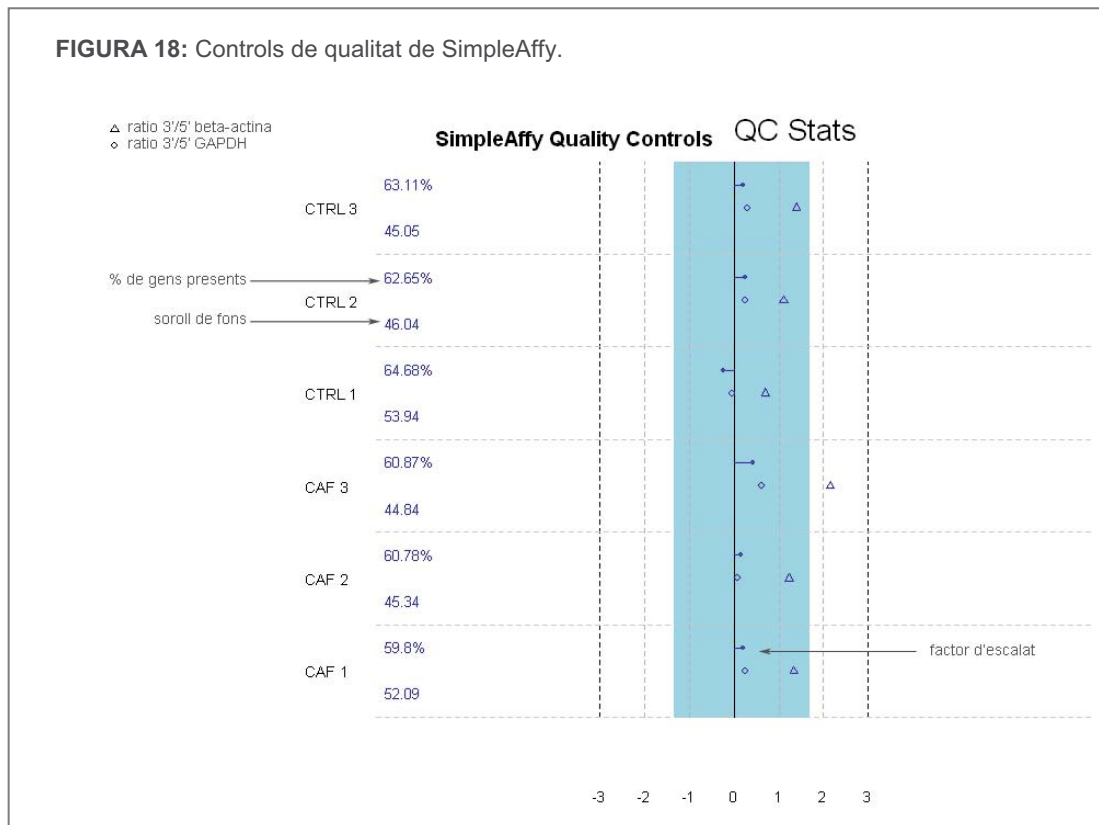
La mitjana dels valors d'escalat aplicats als microarrays realitzats fou de 0,24, amb un valor mínim de 0,16 i un valor màxim de 0,42 (en base 2 logarítmica) (vegeu la figura 18). Així doncs, aquest control de qualitat també fou satisfet.

F. CONTROLS INTERNS GAPDH I  $\beta$ -ACTINA. Les sondes dels microarrays que Affymetrix ha dissenyat per a aquests gens, a diferència de les de la resta de gens, no només es troben en la regió 3' sinó també a la 5'. Aquestes sondes permeten comparar el senyal emès pels fragments d'RNA situats a les regions 3' i 5'. Una ràtio 3'/5' superior a 1, en el cas de GAPDH, i major a 3, en el de  $\beta$ -actina, indicaria que l'RNA estava inicialment degradat o que el procés de retrotranscripció no ha



funcionat correctament.

En els microarrays realitzats, per als controls interns GAPDH i  $\beta$ -actina, s'obtingué una mitjana de la ràtio 3'/5' de 0,24 i 1,32 amb un rang de  $-0,043$  a  $0,61$  i de  $0,7$  a  $2,15$  respectivament (en base 2 logarítmica) (vegeu la figura 18), amb la qual cosa vàrem poder concloure que el procés de retrotranscripció havia funcionat correctament.



G. CONTROLS D'HIBRIDACIÓ bioB, bioC, bioD i cre. Aquests controls són també oligonucleòtids que s'afegeixen a la mostra abans d'hibridar-la (vegeu el procediment descrit en l'apartat 9.2). Aquests transcrits deriven de *Bacillus subtilis*; per tant, cap altre RNA de la mostra s'hauria d'hibridar amb les seves sondes. Es troben en concentracions conegudes i creixents,  $\text{bioB} < \text{bioC} < \text{bioD} < \text{cre}$ , de manera que el senyal que se'n deriva en hibridar-se amb les respectives sondes cal que sigui també creixent. També cal que tots ells siguin detectats com a presents en el microarray; el cas contrari seria indicatiu que el grau de sensibilitat del microarray és inferior a l'esperat.

En els microarrays realitzats s'obtingueren senyals creixents dels controls bioB a cre i tots ells foren detectats com a presents en els microarrays, tal com es mostra

en la taula 4, amb la qual cosa es va concloure que el procés d'hibridació havia estat correcte.

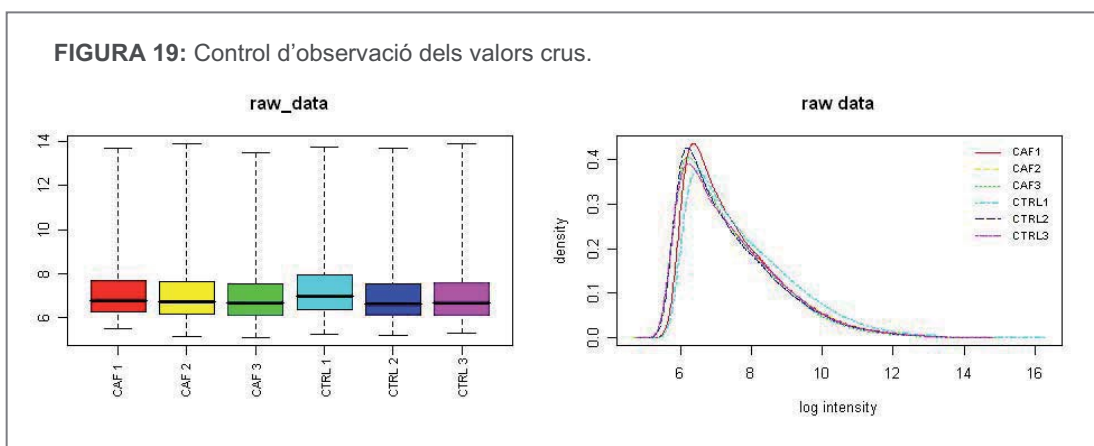
TAULA 4: Controls d'hibridació bioB, bioC, bioD i cre.

	bio B	bio C	bio D	cre
CAF1	7,78	9,39	11,71	13,09
CAF2	7,91	9,50	11,82	13,31
CAF3	7,87	9,49	11,79	13,17
CTRL1	6,83	8,52	10,82	12,36
CTRL2	7,85	9,43	11,76	13,20
CTRL3	7,90	9,50	11,72	13,22

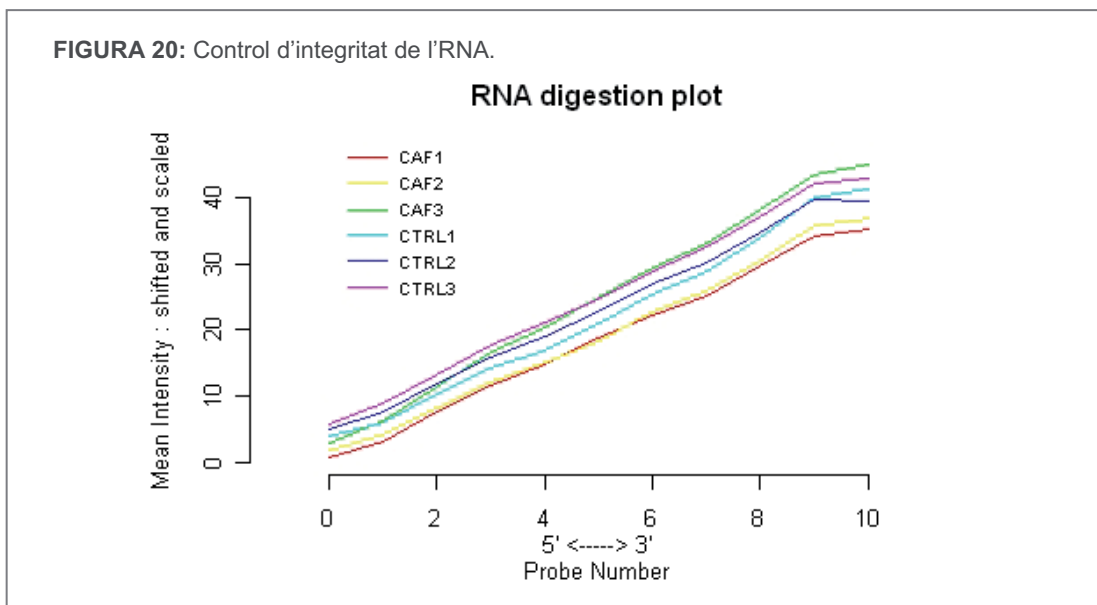
Altres controls de qualitat

Aquests altres controls es varen aplicar tant a les dades crues, és a dir, els valors d'intensitat de cada sonda, com a les dades processades, les quals s'obtingueren sintetitzant els valors d'intensitat de totes les sondes d'un gen a un valor d'expressió per a aquest gen (vegeu l'apartat anterior 9.3). Per dur a terme aquests controls de qualitat es va emprar el paquet informàtic Affy.

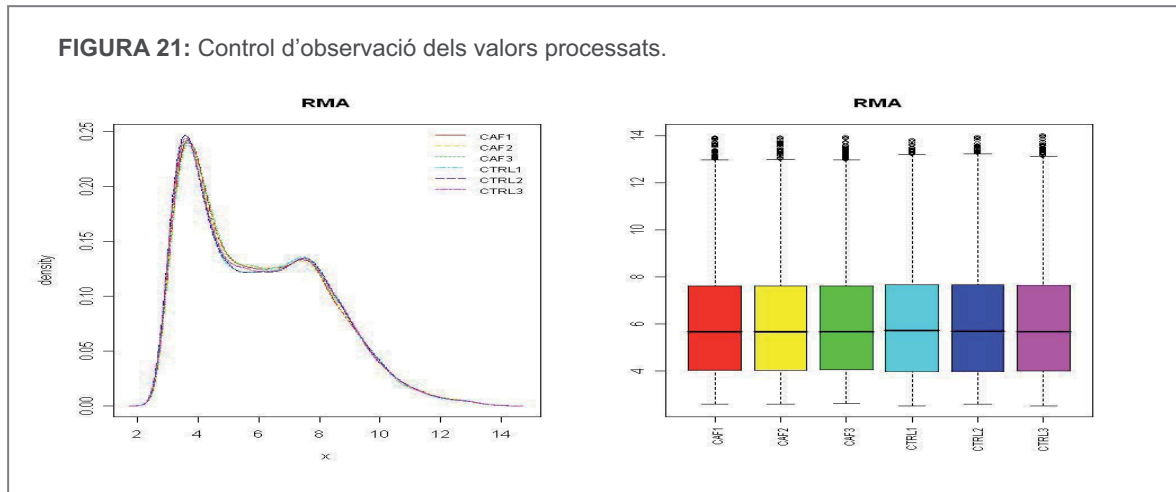
H. OBSERVACIÓ DELS VALORS CRUS DELS MICROARRAYS. En representar els valors d'intensitat obtinguts de cada sonda en diagrames de caixes i histogrames, cal que tots els microarrays tinguin un comportament molt similar i que en l'histograma no s'observi un pic en la part dreta, cosa que indicaria una saturació del fotomultiplicador. Aquestes condicions les varen acomplir els 6 microarrays que vàrem hibridar (vegeu la figura 19).



I. INTEGRITAT DE L'RNA. Tenint en compte que la retrotranscripció de l'RNA es dona de 3' a 5', és d'esperar que dins d'un grup de sondes d'un mateix gen, s'obtingui un major senyal en les situades a 3' que a 5'. Si per a tots els gens, s'ordenen les seves 11 sondes de 5' a 3' i es calcula la mitjana de les intensitats de totes les sondes en cada posició, normalitzant els valors, s'obté un gràfic com el que es mostra en la figura 20. Segons estableix el control, les diferents línies corresponents a cada microarray cal que presentin un comportament similar i mantinguin un paral·lelisme. Tal com es mostra en la figura 20, el comportament dels diferents microarrays realitzats fou molt similar, de manera que el resultat obtingut es pot considerar satisfactori.



J. OBSERVACIÓ DELS VALORS PROCESSATS. En representar els valors processats, és a dir, els valors d'expressió per a cada gen en diagrames de caixes i histogrames, cal que tots els microarrays tinguin un comportament molt similar. Observant la figura 21 es pot comprovar de nou que el comportament de tots els nostres microarrays fou molt uniforme, la qual cosa ens va permetre valorar positivament aquest control de qualitat.



## 9.5. SELECCIÓ DE GENS QUE CODIFIQUEN PER A PROTEÏNES SECRETABLES I IMPLICADES EN PROCESSOS DE PROLIFERACIÓ

Posteriorment a l'anàlisi d'expressió gènica per microarrays ens calgué identificar, del total de gens diferencialment expressats, els que donaven lloc a factors secretables. Aquest triatge es va dur a terme emprant el programa SignalP 3.0 Server de la pàgina web "ExPASy Proteomics Server" (<http://www.expasy.org>) de l'Institut Suís de Bioinformàtica (Nielsen *et al.*, 1999).

També fou necessari realitzar dues seleccions més, la primera, de gens relacionats amb l'obesitat, el teixit adipós i el metabolisme lipídic, i la segona, de gens que estiguessin implicats en processos de proliferació. Aquestes seleccions es varen dur a terme mitjançant la cerca bibliogràfica i emprant la base de dades Gen Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org>). En aquesta última vàrem cercar quins gens estaven associats a uns determinats termes, "anotacions GO", relacionats amb processos proliferació o amb l'obesitat, el teixit adipós i el metabolisme lipídic.

## 10. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER PCR QUANTITATIVA

L'estudi de l'expressió gènica per PCR quantitativa fou emprat per validar els resultats d'expressió gènica obtinguts en els microarrays (vegeu l'apartat 9).

En una PCR convencional únicament es pot mesurar el nombre final de còpies generades en la reacció; en canvi, el mètode de la PCR quantitativa o PCR en temps real, permet monitoritzar la reacció de PCR mentre succeeix i quantificar el nombre de còpies d'un gen present a la mostra a cada cicle d'amplificació mitjançant la utilització de fluorocroms. Aquest sistema també fa possible quantificar el nombre de còpies inicials d'àcid nucleic que hi ha en la mostra, ja que l'amplificació és més ràpida com més elevat és el nombre de còpies inicials, i, per tant, es detecta més aviat un increment en la fluorescència emesa.

En la realització d'aquesta tesi es va utilitzar la tecnologia SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, Califòrnia, EUA), en la qual s'utilitza el fluorocrom SYBR Green, que s'uneix únicament al DNA de doble cadena. Al llarg de la reacció de PCR es generen més amplicons, als quals es va unint el fluorocrom SYBR Green, i com a resultat s'obté un increment en la intensitat de la fluorescència proporcional al producte de PCR amplificat.

Per al procés d'amplificació es va emprar el reactiu comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), que combina el fluorocrom SYBR Green 1 Dye, la polimerasa AmpliTaq Gold DNA Polymerase, un mix de dNTP amb dUTP i un tampó optimitzat per fer la reacció. La reacció de PCR i l'anàlisi de les dades es varen dur a terme amb el sistema 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El procediment que es va seguir és el següent:

1. Preparar les dilucions de les mostres (cDNA de teixits adiposos): per a la reacció de PCR es va utilitzar una dilució 1/50 de tots els cDNA, els quals havien estat prèviament ajustats a una mateixa concentració de 30 ng/μl. Una mostra de cDNA, procedent de teixit adipós peripancreàtic de rata control, fou emprada per establir una recta patró diluint-la 1/2, 1/10, 1/50, 1/100 i 1/1000.
2. Posar per duplicat, en els pous d'una placa "MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate" (Applied Biosystems), 2 μl de les dilucions dels cDNA de les mostres i de la recta patró. Afegir també en dos pous, 2 μl d'H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> que ens serviran de control negatiu per descartar contaminacions de DNA exògens.
3. Preparar la mescla de reacció i afegir-ne 18 μl als 2 μl de cDNA.

MESCLA PER A CADA REACCIÓ	
Power SYBR Green Master Mix 2X	10 µl
Encebadors 3' a 20 µM	0,5 µl
Encebadors 5' a 20 µM	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	7 µl

#### 4. Realitzar l'amplificació en les següents condicions:

CONDICIONS DE LA REACCIÓ	
50 °C durant 2 minuts	
95 °C durant 10 minuts	
40 cicles de:	95 °C durant 15 segons
	60 °C durant 1 minut

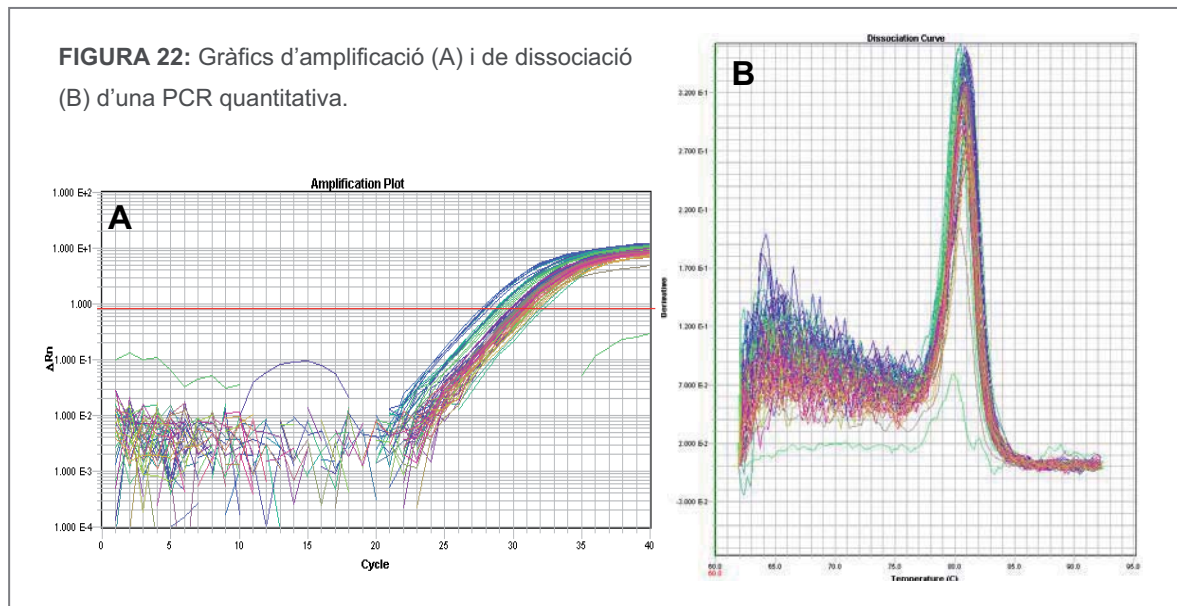
Una vegada acabada la reacció es va obtenir el resultat per a cada mostra interpolant-lo a partir de la recta patró. Així doncs, la quantificació que es va fer fou relativa i es va expressar com un valor de dilució respecte de la mostra emprada per fer la recta patró. Finalment, els resultats d'expressió gènica obtinguts per a cada gen es varen normalitzar per l'expressió d'un gen d'expressió constitutiva: el *TATA-box binding protein* (*Tbp*).

La recta patró també es va utilitzar per calcular l'eficiència de la reacció a partir de la mesura del seu pendent; així, valors de pendent de  $-3,33$  indiquen una eficiència de la PCR del 100%. Si el pendent és superior a  $-3,33$  indica que no s'ha obtingut una eficiència del 100%, és a dir, que no totes les cadenes s'amplifiquen en el cicle següent.

Al final de la seqüència de cicles de cada amplificació també es va realitzar una corba de dissociació (un gradient de temperatura que augmenta un grau cada 15 segons des de 60 fins a 95 °C), a fi de comprovar que el producte amplificat era únic. La temperatura a la qual les dues cadenes del DNA se separen es pot detectar perquè el SYBR Green deixa d'emetre fluorescència. Si, tal com és d'esperar, s'ha amplificat un únic producte de PCR, tot el DNA se separarà a la mateixa temperatura (ja que cada amplicó té una temperatura de dissociació específica) i en el gràfics de dissociació obtindrem un sol pic (vegeu la figura 22).

## Material i mètodes

Els encebadors emprats en la PCR quantitativa, els quals es detallen en la taula 5, foren dissenyats mitjançant el programa Primer Express Software v2.0 (Applied Biosystems) partint de la seqüència de l'RNAm obtinguda de la pàgina web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Realitzant un Megablast en aquesta mateixa pàgina web, es va assegurar l'especificitat dels primers dissenyats.



**TAULA 5:** Encebadors emprats en la PCR quantitativa.

<b><i>Cgref1</i></b>	5': AATGTGGTTGAGGCTCATAGCA 3': GGGCATGAGCCTGTGTGTCT	<b><i>Ghrt</i></b>	5': TATTTTCAAGCAGCAAAGT 3': ATTGTAGAAGTCGGGTTTGT
<b><i>Clu</i></b>	5': CCTGCGCCAGGAGCTAAAC 3': GGAATGAAGCAGCTCGTTGTACT	<b><i>Igf1</i></b>	5': CCGCTGCAAGCTACAAAGT 3': TGAGTCTTGGGCATGTCAGTGT
<b><i>Egfl7</i></b>	5': TCAGTGCCCATGTTGGATTG 3': CACCGGACAGCACTTGAAGTCT	<b><i>Igfbp3</i></b>	5': TGCTGGGAGTGTGGAAGC 3': GAGTGGATGGAAGTGAATCAG
<b><i>Fgf18</i></b>	5': AACTACACGGCCCTGATGTCA 3': GCCGCCCTTCTTGGT	<b><i>Lep</i></b>	5': ATTTACACACGCAGTCG 3': AGCCAGGAATGAAGTCCAA
<b><i>Gdf10</i></b>	5': GACAGCCAGGCTGAGACCAA 3': CTACCACGACGCGGAAGAA	<b><i>Ptn</i></b>	5': CACAATGCCGACTGTCAGAAA 3': CTTGAGGCTTGGGCTTGGT
<b><i>Ghbp</i></b>	5': AACGTTTCTCAGATGGACACA 3': GTGGGTGCTGGGAATTGAAC	<b><i>Sfrp4</i></b>	5': AAGCCACCCTTACAGGATAAGGT 3': GGTCTAAGGCAAGTGGTGTGT
<b><i>Ghr</i></b>	5': TATTTTCAAGCAGCAAAGG 3': ATTGTAGAAGTCGGGTTTGT	<b><i>Tbp</i></b>	5': GACATCACCTGCAGCATCA 3': GCAGTGCCGCCAAGTAG

## 11. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES

### 11.1. HOMOGENEÏTZACIÓ DELS TEIXITS

Els teixits emprats per a l'extracció de proteïnes els vàrem congelar en nitrogen líquid immediatament després de la seva extracció i foren conservats a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El protocol seguit, partint aproximadament de 200  $\mu\text{g}$  de teixit adipós, és el següent:

1. Homogeneïtzar els teixits amb tampó d'homogeneïtzació de proteïna <sup>a</sup> fred (400  $\mu\text{l}$  tampó / 200  $\mu\text{g}$  de teixit) mitjançant un politró (T8-10, Ika-Labortechnik, Staufen, Alemanya).
2. Mantenir els homogenats en gel entre 30 minuts i una hora.
3. Centrifugar durant 30 minuts a 14.000 rpm i  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
4. Recuperar el sobrenedant amb compte de no agafar la fase lipídica de la part superior o el sediment.
5. Conservar l'extracte proteic a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Descongelar-lo en gel per utilitzar-lo.

<sup>a</sup> **Tampó d'homogeneïtzació de proteïnes:** 50 mM de tampó tris (Sigma) pH=7,5; 150 mM de clorur de sodi (Sigma); 1% de Tritó X-100 (Sigma); 10 mM de fosfat de sodi (Sigma); 10 mM de fluorur de sodi (Sigma) i 1 mM de vanadat de sodi (Sigma). Afegir en fresc, un còctel d'inhibidors de proteases (Sigma).

### 11.2. VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA

La valoració de la concentració de proteïnes en els homogenats de teixits es va portar a terme mitjançant un sistema comercial (DC Protein Assay; Bio-Rad, Hercules, Califòrnia, EUA) basat en el mètode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). L'assaig es va realitzar en plaques de 96 pous, seguint el protocol detallat pel fabricant, que és el següent:

1. Elaborar la recta patró utilitzant un estàndard de BSA (Bio-Rad).
2. Diluir si cal les mostres i també el tampó d'homogeneïtzació (serveix de blanc).
3. Posar 5  $\mu\text{l}$  de cada mostra diluïda, del tampó d'homogeneïtzació i de cada punt de la recta patró de l'estàndard de BSA en una placa de 98 pous, per triplicat.
4. Afegir 25  $\mu\text{l}$  de la solució A' (composta per les solucions A i S en relació 50:1).
5. Afegir 200  $\mu\text{l}$  de la solució B.
6. Llegir l'absorbància a 750 nm, restar el valor d'absorbància del blanc al de les mostres i interpolar les concentracions de les mostres a partir dels resultats de la recta patró.



## 12. ESTUDI DE L'EXPRESSION PROTEICA PER WESTERN BLOT O LIGAND BLOT

Per a l'estudi de l'expressió proteica d'Igfbp3 en homogenats de teixits, i la normalització d'aquesta mitjançant l'expressió d'actina, vàrem emprar la tècnica del Western Blot (WB). En el cas de les mostres de sèrum o de medi condicionat, en canvi, vàrem dur a terme una metodologia similar àmpliament utilitzada per detectar les Igfbp en fluids biològics, el Ligand Blot (LB) (Fowlkes i Serra, 1996; Hossenlopp *et al.*, 1986). La diferència principal entre ambdues tècniques es troba en el mètode de detecció de la proteïna, que en el Western Blot es realitza mitjançant un anticòs específic contra la proteïna i en el Ligand Blot emprant un lligand natural d'aquesta (Igf1 o Igf2 en el cas de la Igfbp3). Els dos mètodes són molt semblants, a continuació indiquem els passos de què consten i les diferències entre els procediments que vàrem dur a terme per a un o l'altre:

### A. SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA DE LES PROTEÏNES (vegeu l'apartat 12.1)

*Western Blot:* les mostres es varen diluir en tampó de càrrega amb un agent reductor (2-mercaptoetanol) per tal de trencar els ponts disulfur i fer les proteïnes més solubles.

*Ligand Blot:* les mostres es varen diluir en tampó de càrrega sense 2-mercaptoetanol per tal que les proteïnes conservessin la seva conformació i poguessin ser reconegudes pel lligand.

### B. TRANSFERÈNCIA DE LES PROTEÏNES DEL GEL A UNA MEMBRANA SINTÈTICA

*Western Blot:* la transferència fou humida i sobre una membrana de PVDF (apartat 12.2).

*Ligand Blot:* la transferència fou semiseca i sobre una membrana de poliacrilamida (apartat 12.3).

### C. DETECCIÓ ESPECÍFICA DE LA PROTEÏNA D'INTERÈS

*Western Blot:* la detecció es realitzà per mitjà d'un anticòs contra Igfbp3 (apartat 12.4).

*Ligand Blot:* la detecció es realitzà per mitjà d'un lligand d'Igfbp3, Igf2 (apartat 12.5).

## 12.1. ELECTROFORESI DESNATURALITZANT EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gel d'acrilamida-bisacrilamida en presència d'SDS (SDS-PAGE) s'utilitza per a la separació de proteïnes en funció de la seva massa. El detergent SDS desnatura i confereix càrrega negativa a les proteïnes, de manera que, en una matriu de poliacrilamida sotmesa a un camp elèctric, les proteïnes avancen cap al pol positiu a diferent velocitat segons la seva massa.

Aquest tipus d'electroforesi està formada per dos tipus de gels: el concentrador (*stacking*) i el separador (*resolving*). La diferent composició dels gels permet la concentració de les proteïnes en el límit entre ambdós gels, punt a partir del qual s'inicia la separació per massa. La porositat del gel s'escull en funció de la mida de les proteïnes que es vulguin separar i es controla modificant la concentració d'acrilamida-bisacrilamida. Els estudis realitzats en aquesta tesi es varen portar a terme amb el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. El procediment es detalla a continuació:

#### Preparació de les mostres

- 1A. En el cas de les mostres de medi condicionat, precipitar-les amb acetona: afegir a un mateix volum (2ml) de totes les mostres 5 volums d'acetona freda (Panreac), deixar precipitar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 30 minuts, centrifugar 20 minuts a 13.000 rpm, descartar el sobrenedant i deixar assecar el precipitat.
- 1B. En el cas de les mostres d'homogenats de teixits o de sèrum: disposar en un tub eppendorf el volum necessari de cada mostra per tal d'obtenir la quantitat de proteïna desitjada. Fer el mateix amb una mostra de marcador de pes molecular d'un determinat rang de massa en funció de la proteïna (Bio-Rad).
2. Afegir la quantitat necessària de tampó de càrrega Laemmli 2X<sup>a</sup> (amb 2-mercaptoetanol en el cas del WB i sense, en el cas del WL).
3. Enrasar amb aigua destil·lada per tal d'aconseguir el mateix volum a totes les mostres.
4. Desnaturalitzar les mostres a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 10 minuts (WB) o 5 minuts (WL) i ràpidament posar-les en gel fins que es carreguin.

#### Electroforesi

1. Polimeritzar els gels entre els vidres del sistema (vegeu-ne la composició en la taula adjunta). Primer preparar el gel separador i abocar-lo entre els vidres deixant uns 2 centímetres de marge per al gel concentrador. Afegir una capa prima de butanol (Carlo Erba, Rodano, Itàlia) saturat amb aigua (1:1) per tal d'eliminar bombolles, alinear la superfície i impedir de la inhibició de la polimerització per l'oxigen atmosfèric.
2. Una vegada polimeritzat el gel separador, preparar el gel concentrador i abocar-lo entre els vidres, sobre el gel separador. Insertar la pinta que forma els pous de càrrega.
3. Una vegada polimeritzat, retirar la pinta, col·locar el gel en el suport d'electroforesi i dins la cubeta. Omplir amb tampó d'electroforesi<sup>b</sup> fins a cobrir el gel.

## Material i mètodes

4. Carregar les mostres de proteïna i el marcador en els pous corresponents.
5. Tancar el circuit elèctric i connectar l'electroforesi (150 V). Aturar quan el front del colorant arriba al final del gel o bé posteriorment, per tal d'afavorir la separació de les proteïnes de major pes molecular.
6. Desmuntar el sistema i separar el gel dels vidres. Eliminar la porció corresponent al gel concentrador. Iniciar el protocol de transferència de proteïnes.

**<sup>a</sup> Tampó de càrrega Laemmli 2X:** 125 mM de tris-HCL (Serva, Heidelberg, Alemanya) (pH=6,8), 20% de glicerol (Carlo Erba), 4% de SDS (Serva), 10% de 2-mercaptoetanol i traces de blau de bromofenol (Sigma-Aldrich).

**<sup>b</sup> Tampó d'electroforesi** (pH=8,3): 25 mM de tris-HCL, 192 mM de glicina i 0,1% de SDS.

COMPOSICIÓ DELS GELS	CONCENTRADOR	SEPARADOR	
Acrilamida	Solució acril/bis-acril al 30% (29/1)	5 %	10 %
Bis-N, N'-metilen-bis-acrilamida	(Bio-Rad)	0,167 %	0,330 %
Tris-HCl (pH=6,8)		0,127 M	0,375 %
Dodecil sulfat de sodi (SDS) (Serva)		0,1 %	0,1 %
Persulfat d'amoni (APS) (Bio-Rad)		0,1 %	0,1 %
N, N, N, N'-tetra-metil-etilendiamina (TEMED) (Bio-Rad)		0,1 %	0,04 %

## 12.2. TRANSFERÈNCIA HUMIDA

En aquest sistema es col·loquen el gel i la membrana dins d'una cubeta, completament coberts de tampó, en posició vertical i entre dos elèctrodes que creen el camp elèctric que fa avançar les proteïnes del gel a la membrana. El protocol que vàrem seguir fou el següent, emprant el sistema de transferència Mini-Protean de Bio-Rad:

1. Tallar 2 papers 3MM (Whatman®) i una membrana de PVDF (Perkin Elmer, Boston, EUA) de la mateixa mida que el gel separador.
2. Activar la membrana de PVDF submergint-la 1 minut en metanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, França) i deixar-la en aigua destil·lada durant 1 minut més. Aquesta activació caldrà repetir-la cada vegada que la membrana es deixi assecar.
3. Submergir en tampó de transferència <sup>a</sup> el gel separador, la membrana, els

papers 3MM i les esponges de l'aparell de transferència durant uns minuts.

4. Col·locar dins del "sandvitx" de l'aparell de transferència una esponja, un paper 3MM, el gel, la membrana, un altre paper 3MM i una altra esponja. És important mantenir-ho tot humitejat amb tampó de transferència, seguir l'ordre especificat i evitar la formació de bombolles entre el gel i la membrana.
5. Tancar el "sandvitx" i col·locar-lo dins la cubeta de manera que el gel quedi en el costat del pol negatiu i la membrana en el del pol positiu.
6. Omplir la cubeta de tampó de transferència, tancar l'aparell i aplicar un voltatge de 50 V durant 3 hores a 4 °C.
7. Desmuntar el sistema, recuperar la membrana i marcar-hi el costat on s'han transferit les proteïnes.
8. Per tal de comprovar l'eficiència de la transferència i la càrrega proteica es pot tenyir la membrana amb una solució de roig Ponceau <sup>b</sup>. Destenyir amb aigua.
9. Guardar la membrana entre papers 3MM a 4 °C o iniciar la immunodetecció.

<sup>a</sup> **Tampó de transferència humida:** (pH=8,3): 25 mM de tris-HCL, 192 mM de glicina i 20% de metanol.

<sup>b</sup> **Solució roig de Ponceau:** 0,2% de roig Ponceau (Sigma-Aldrich) en àcid tricloracètic al 3%.

### 12.3. TRANSFERÈNCIA SEMISECA

En aquest tipus de transferència, el gel i la membrana es disposen horitzontalment entre diversos papers 3MM humitejats en tampó que estan en contacte amb dos elèctrodes. L'avantatge d'aquest sistema és que en trobar-se els dos elèctrodes a menys distància, es pot aconseguir una major intensitat de corrent i la transferència és més ràpida. A continuació s'indiquen els passos a seguir:

1. Tallar una membrana de nitrocel·lulosa (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire, EUA) i 12 papers 3MM (Whatman®) de la mateixa mida que el gel separador.
2. Equilibrar el gel separador amb tampó de transferència <sup>a</sup> durant uns minuts. Realitzar la mateixa operació amb una membrana de nitrocel·lulosa i els 12 papers.
3. Muntar el sistema de transferència sobre l'aparell de transferència (Trans-Blot SD Bio-Rad) col·locant l'un a sobre de l'altre: 6 papers 3MM, la membrana de nitrocel·lulosa, el gel i 6 papers 3MM més. És important mantenir-ho tot humitejat amb tampó de transferència, seguir l'ordre especificat i evitar la

formació de bombolles entre el gel i la membrana.

4. Tancar l'aparell i aplicar un amperatge constant (150 mA) durant 15-20 minuts. La transferència finalitza quan el voltatge s'ha estabilitzat.
5. Desmuntar el sistema, recuperar la membrana i marcar-la adequadament. Per tal de comprovar l'eficiència de la transferència es pot tenyir la membrana amb una solució de roig Ponceau (vegeu la secció 10.2).
6. Guardar la membrana entre papers 3MM a 4 °C o iniciar la immunodetecció.

<sup>a</sup> **Tampó de transferència semiseca** (pH=8,3): 25 mM de tris-HCL, 192 mM de glicina i 0,1% de SDS.

## 12.4. IMMUNODETECCIÓ SOBRE MEMBRANA DE PVDF

Aquest procés permet la detecció específica d'una proteïna d'interès sobre la membrana on s'han transferit les proteïnes aprofitant les propietats de reconeixement entre antigen i anticòs. El procediment a seguir és el següent:

1. **BLOQUEIG DE LA MEMBRANA:** per tal d'evitar les unions inespecífiques de l'anticòs primari, bloquejar la membrana durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació amb una solució rica en proteïnes de llet descremada o BSA (vegeu la taula adjunta) en tampó TBS-Tween <sup>a</sup>.
2. **INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS PRIMARI:** incubar amb l'anticòs primari contra la proteïna d'interès (vegeu la taula adjunta) diluït en tampó TBS-Tween durant tota una nit a 4 °C i en agitació.
3. Rentar la membrana amb tampó TBS-Tween 3 vegades durant 15 minuts cadascuna, a temperatura ambient i en agitació.
4. **INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS SECUNDARI:** incubar amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa (vegeu la taula adjunta) diluït en tampó TBS-Tween durant 2 hores, a 4 °C i en agitació.
5. Rentar la membrana amb tampó TBS-Tween 3 vegades durant 15 minuts cadascuna, a temperatura ambient i en agitació
6. **REVELATGE DE LA PEROXIDASA:** incubar la membrana 1 minut en reactiu ECL (Enhanced Chemiluminescence; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Anglaterra).
7. Exposar la membrana a un film fotogràfic dins d'un casset i revelar.

<sup>a</sup> **TBS-Tween:** 20mM de tris-HCL (pH=8), 150mM de NaCl (Serva) i 0,05% de Tween-20 (Sigma).

ANTICÒS PRIMARI	BLOQUEIG	DILUCIÓ	ANTICÒS SECUNDARI	DILUCIÓ
Anti-Igfbp3 de rata (Upstate)	Llet al 5%	1/1000	Anti-rabbit-HRP (Amersham)	1/5000
Anti-actina (Sigma-Aldrich)	Llet al 3%	1/500	Anti-rabbit-HRP (Amersham)	1/5000

## 12.5. DETECCIÓ MITJANÇANT UN LLIGAND SOBRE MEMBRANA DE POLIACRILAMIDA

Per a detectar la proteïna Igfbp3 en medi condicionat o en sèrum vàrem emprar un *kit* comercial d'IBT (Immunological & Biochemical Testsystems, Reutlingen, Alemanya). En aquest s'empra un Igf2 biotilinat seguit d'una estreptavidina conjugada a peroxidasa per detectar les diferents Igfbp. La identificació de cadascuna d'elles es fa en base al seu pes molecular. Els passos dels quals consta el protocol són els següents:

1. **QUENCHING:** incubar la membrana amb la solució de *quenching* durant 20 minuts, a temperatura ambient i en agitació.
2. **BLOQUEIG DE LA MEMBRANA:** incubar la membrana amb la solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació.
3. **INCUBACIÓ AMB EL LLIGAND:** incubar la membrana amb l'Igf2 biotilinat diluït 1/500 en solució de bloqueig durant tota una nit, a temperatura ambient i en agitació.
4. Rentar la membrana amb la solució de rentat 5 vegades durant 5 minuts cadascuna, a temperatura ambient i en agitació
5. **INCUBACIÓ AMB L'ESTREPTAVIDINA-PEROXIDASA:** Incubar amb estreptavidina-peroxidasa diluïda 1/100 en solució de bloqueig durant 2 hores a temperatura ambient i en agitació.
6. Rentar la membrana amb la solució de rentat 5 vegades durant 5 minuts cadascuna, a temperatura ambient i en agitació.
7. **REVELATGE DE LA PEROXIDASA:** Incubar la membrana 1 minut en el reactiu ECL proporcionat pel *kit* comercial.
8. Exposar la membrana a un film fotogràfic dins d'un casset i revelar.

## 12.6. REUTILITZACIÓ DE LES MEMBRANES (*STRIPPING*)

Una vegada finalitzat l'assaig de transferència per Western Blot, les membranes poden reutilitzar-se per a l'estudi d'altres proteïnes. El procés que cal seguir és el següent:

1. Posar la membrana en solució d'*stripping*<sup>a</sup> 30 minuts a 50 °C i en agitació.
2. Rentar abundantment amb solució de rentat fins que les membranes han perdut l'olor de  $\beta$ -mercaptoetanol.
3. Començar de nou el protocol d'immunodetecció.

<sup>a</sup> **Solució d'*stripping***: 62,5 mM de Tris-HCL, 100 mM de 2-mercaptoetanol i 2% de SDS.

## 13. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els resultats presentats en aquest estudi són la mitjana  $\pm$  SEM (error estàndard de la mitjana). L'anàlisi estadística fou realitzat en funció del disseny experimental en cada cas. En primer lloc, es va comprovar la normalitat de les dades mitjançant el test de Kolgomorov-Smirnov. En el cas de les mostres que seguien la distribució normal, es va emprar un T-test o una ANOVA (*analysis of variance*) per determinar les diferències entre les mitjanes de dos o més grups experimentals respectivament. Quan les mostres no seguien la distribució normal, els tests que vàrem fer servir per determinar si aquestes eren significativament diferents foren els de Mann-Whitney (per a comparar dos grups) o de Kruskal-Wallis (per a comparar més de dos grups). En els peus de figura dels resultats es detallen els tests estadístics per a cadascuna de les aproximacions experimentals, aplicats mitjançant el programa SPSS. Les diferències entre grups es varen considerar significatives amb una  $p < 0,05$ .

## **IV. RESULTATS**





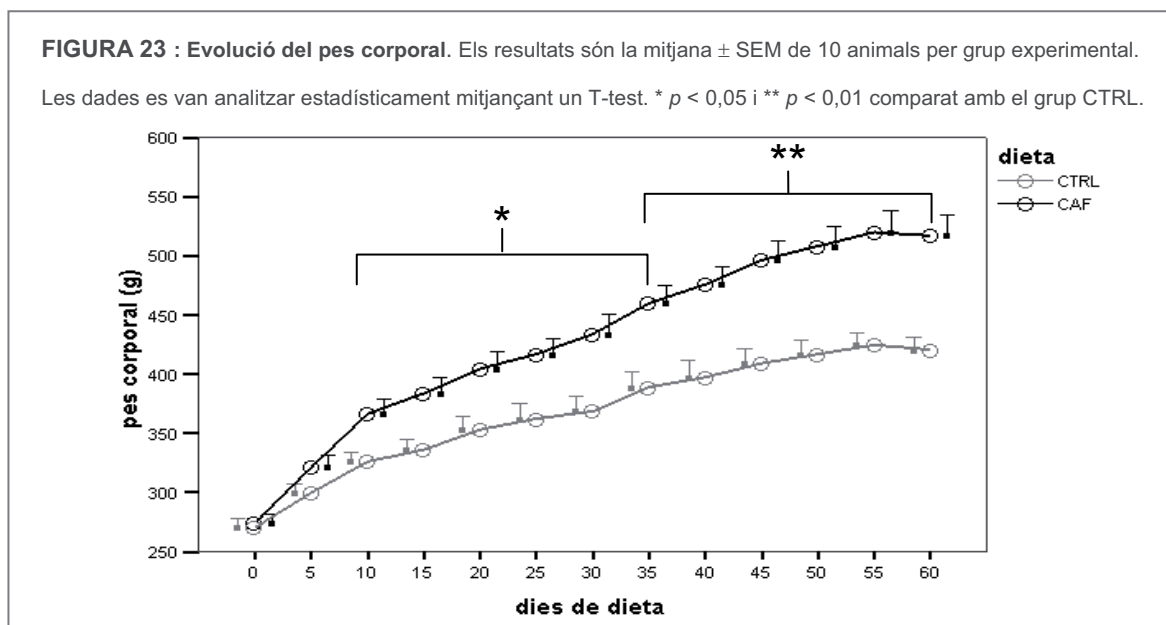
## 1. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL D'OBESITAT

Per tal d'obtenir un model d'obesitat en rata, en el qual poguéssim comprovar la nostra hipòtesi de treball, vàrem escollir la dieta de cafeteria, ja que permetia obtenir un ràpid increment del pes corporal i aconseguir un fenotip obès de manera molt similar a com succeeix en l'obesitat humana. Aquest model de rata de cafeteria ja havia estat posat a punt prèviament en el nostre laboratori, introduint certes modificacions a la dieta descrita prèviament per Prats i col.laboradors (Prats *et al.*, 1989). Alguns paràmetres físics i metabòlics es troben descrits en dues publicacions prèvies (Claret *et al.*, 2004; Claret *et al.*, 2005).

En la caracterització del model de la present tesi es varen mesurar diferents paràmetres físics i metabòlics, per tal de constatar l'efectivitat de la dieta en els nostres animals, i es va incloure en l'anàlisi un nou temps de dieta de 10 dies, a més dels 30 i 60 dies de dieta descrits prèviament. També vàrem realitzar una descripció morfomètrica del pàncrees per determinar si l'obesitat que induïem provocava l'expansió de massa de cèl·lula beta, en la qual se centrava l'objectiu d'aquesta tesi.

### 1.1. EFECTE DE LA DIETA DE CAFETERIA SOBRE EL PES CORPORAL

L'administració de la dieta de cafeteria va provocar un ràpid increment en el pes corporal dels animals (vegeu la figura 23); les diferències entre el pes absolut del grup control i el del grup de cafeteria es varen poder apreciar molt aviat, de manera significativa des dels 10 dies de dieta i s'incrementaren progressivament al llarg del temps. En les rates alimentades amb la dieta de cafeteria l'augment del guany ponderal aconseguit respecte a les rates control fou d'un 36, un 61 i un 92%, als 10, 30 i 60 dies respectivament.



## 1.2. ESTUDI GRAVIMÈTRIC I MORFOLÒGIC DEL TEIXIT ADIPÓS

Una vegada finalitzat el període d'inducció d'obesitat de 10, 30 o 60 dies, es varen sacrificar els animals i es van dur a terme mesures gravimètriques de diferents dipòsits de teixit adipós, les quals es mostren en la figura 24.

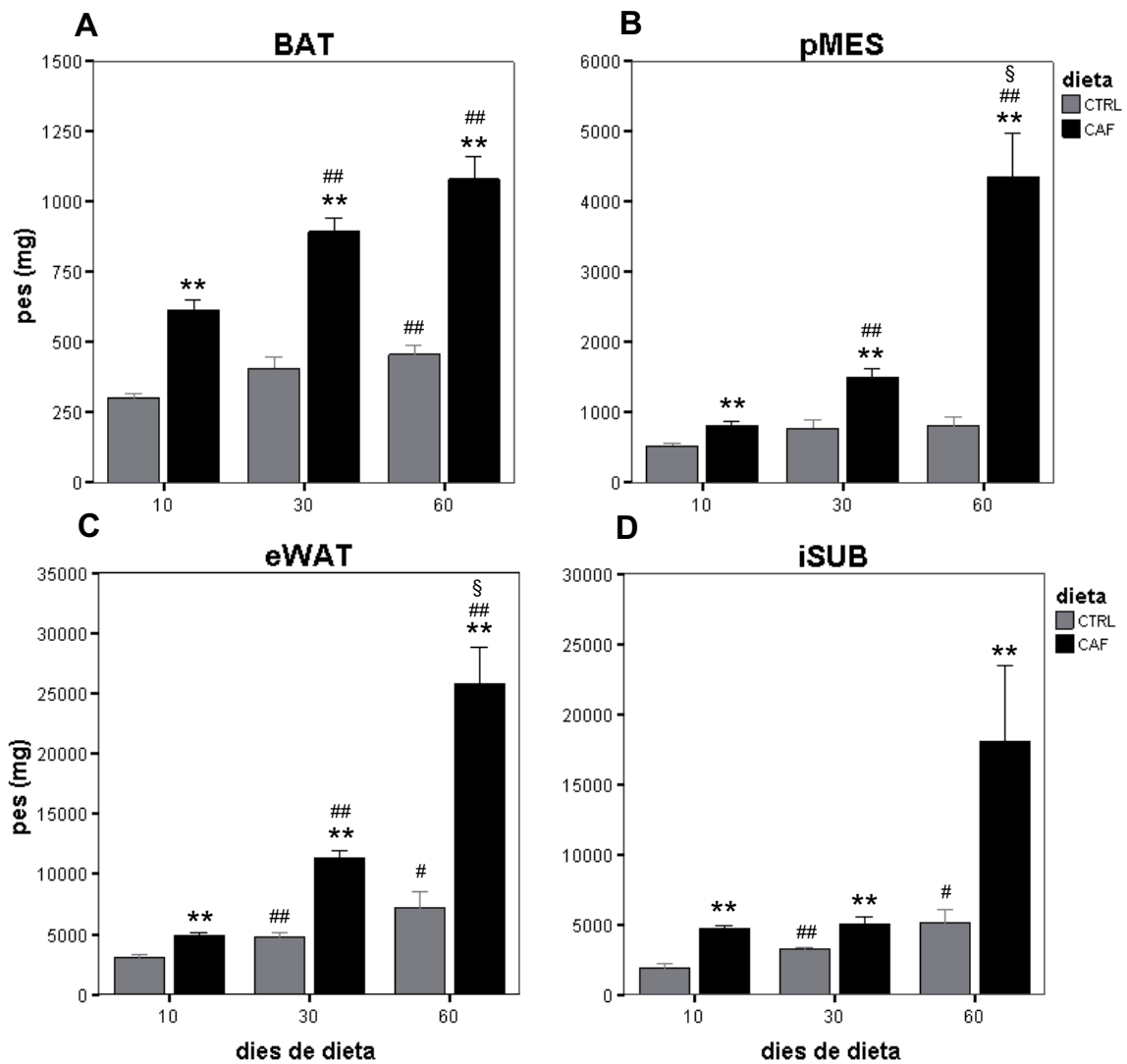
Com a dipòsit representatiu de teixit adipós marró vàrem emprar l'interescapular (BAT). En tots els temps de dieta analitzats el seu pes era més de dues vegades superior en el grup de rates de cafeteria que en el de les control, una diferència que era significativa. Dins de cada grup dietètic també s'observava un increment progressiu en el pes d'aquest dipòsit al llarg del temps, el qual era molt més evident en les rates alimentades amb la dieta de cafeteria que en les alimentades amb la dieta control (vegeu la figura 24A).

Pel que fa al teixit adipós blanc, es varen mesurar tres dipòsits diferents. Un d'ells fou de tipus subcutani, l'inguinal (iSUB), i els altres dos viscerals, l'epididimari (eWAT) i la part del mesentèric que rodeja el pàncrees, el qual vàrem anomenar "pancreàtic mesentèric" (pMES). Aquest últim, atès l'objectiu de la present tesi, es va considerar interessant tenir-lo en compte per la seva proximitat al pàncrees.

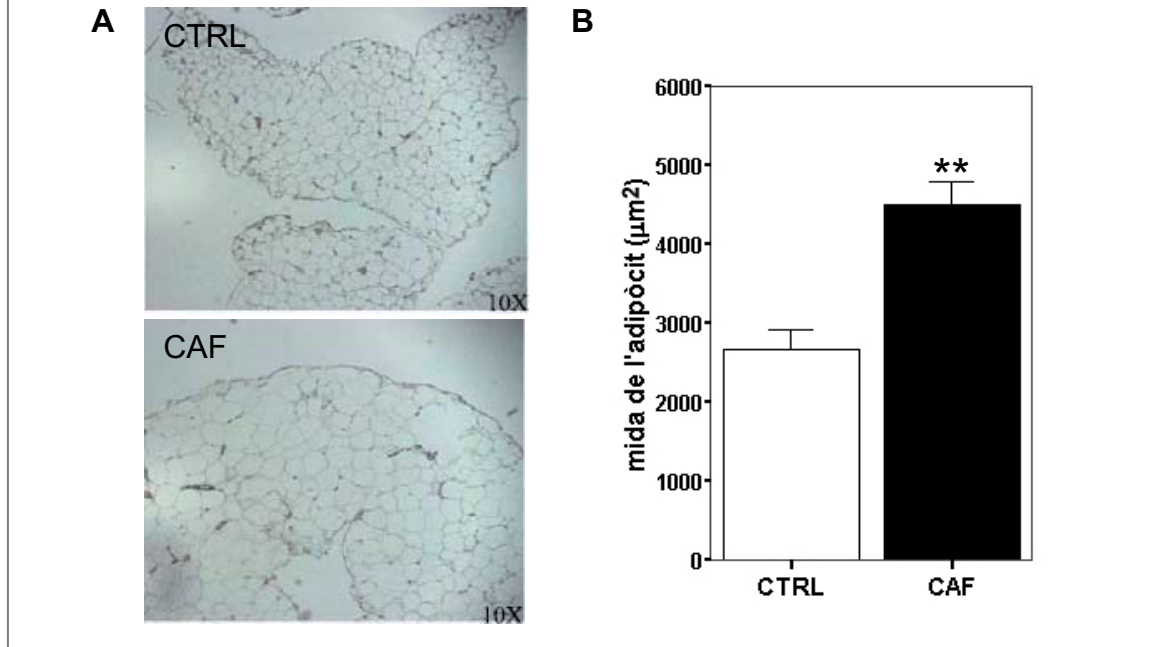
L'administració de la dieta de cafeteria va incrementar marcadament el pes de tots els dipòsits de teixit adipós blanc analitzats. Aquesta major deposició de greix en les rates de cafeteria fou ja significativament detectable des dels 10 dies i acabà sent molt notable als 60 dies de dieta (vegeu les figures 24B, 24C i 24D).

En els treballs previs de M. Claret ja s'havia pogut comprovar que aquest increment de l'adipositat estava mitjançat, en part, per una hipertròfia dels adipòcits, la qual fou detectada mitjançant una anàlisi morfomètrica del dipòsit eWAT. Aquesta dada resultava interessant per al nostre estudi ja que, segons s'ha descrit, la hipertròfia dels adipòcits induïx canvis importants en el seu patró de secreció d'adipocitocines (Marques *et al.*, 1998). Per aquest motiu vàrem voler comprovar la presència d'hipertròfia adipocitària en un altre dipòsit de teixit adipós, concretament el pMES, i confirmar que aquesta també era induïda en el mateix per l'obesitat (vegeu la figura 25).

**FIGURA 24: Valors gravimètrics de diferents teixits adiposos.** Teixit adipós marró interescapular, BAT (A); teixit adipós blanc mesentèric del voltant del pàncrees, pMES (B); teixit adipós blanc epididimari, eWAT (C); teixit adipós blanc inguinal subcutani, iSUB (D). Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 a 12 animals per grup experimental. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test (per comparar CAF i CTRL) o una ANOVA (per comparar els diferents dies de dieta). \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$  comparat amb el grup de rates CTRL dels mateixos dies de dieta. #  $p < 0,05$  i ##  $p < 0,01$  comparat amb el grup de rates de 10 dies de la mateixa dieta. §  $p < 0,05$  i §§  $p < 0,01$  comparat amb el grup de rates de 30 dies de la mateixa dieta.



**FIGURA 25: Morfometria del teixit adipós pMES.** Imatges representatives de seccions tenyides amb hematoxilina i eosina de teixit adipós pMES de rates CTRL i CAF de 30 dies de dieta (A) i anàlisi morfomètrica de les mateixes (B). En B, els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 5 animals per grup experimental. Les dades es van analitzar estadísticament mitjançant un T-test.  $** p < 0,01$  comparat amb el grup de rates CTRL.



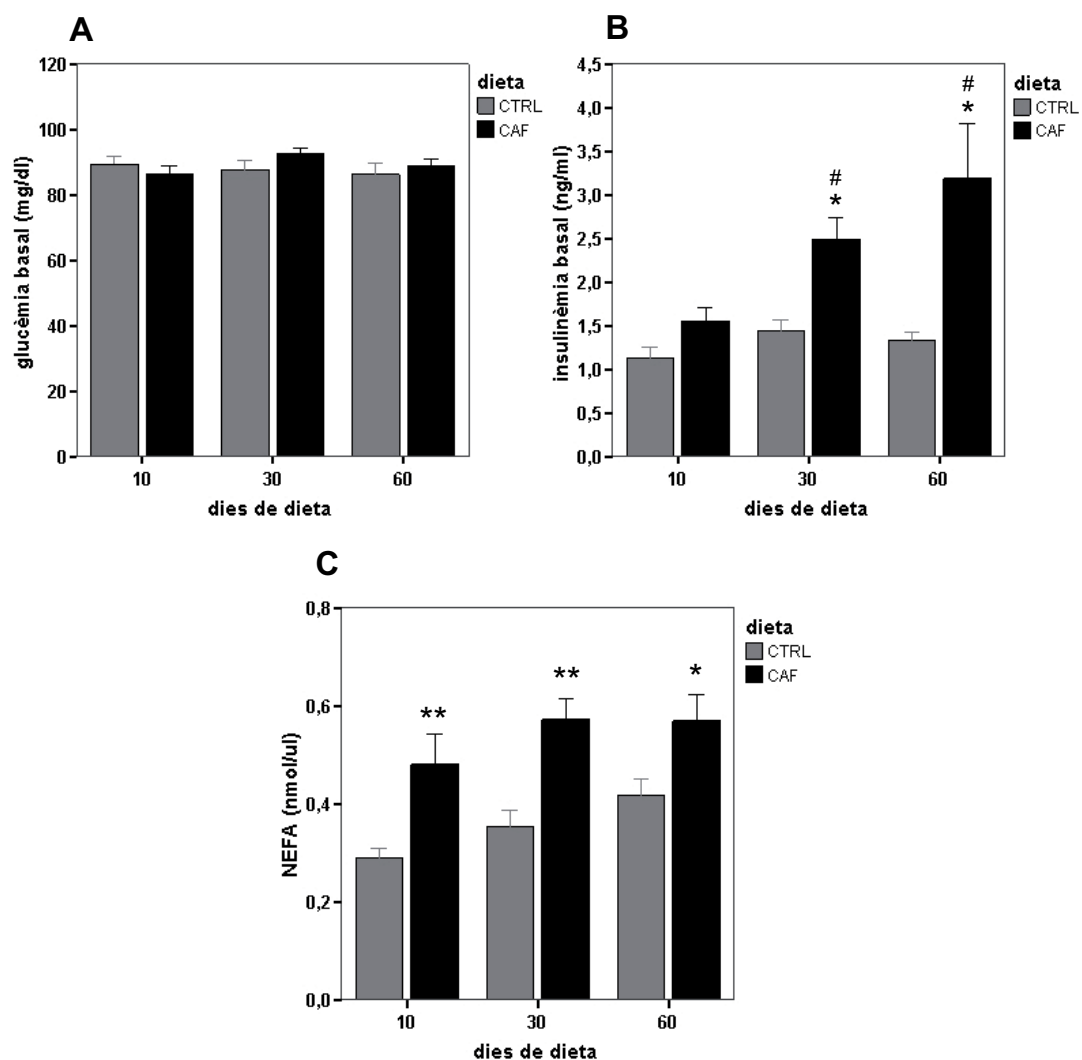
### 1.3. EFECTE DE LA DE DIETA DE CAFETERIA SOBRE PARÀMETRES BIOQUÍMICS

Per tal de caracteritzar el perfil metabòlic del nostre model vàrem dur a terme diferents determinacions bioquímiques. En estat basal, després d'un dejú de 5 hores, les rates alimentades amb dieta de cafeteria mostraren majors nivells plasmàtics d'insulina i àcids grassos no esterificats (NEFA). La hiperinsulinèmia originada per la dieta de cafeteria fou significativa a partir dels 30 dies i arribà a doblar els valors de les rates control als 60 dies (vegeu la figura 26B). Els nivells de NEFA ja es detectaren significativament elevats en les rates de cafeteria als 10 dies de dieta (vegeu la figura 26C).

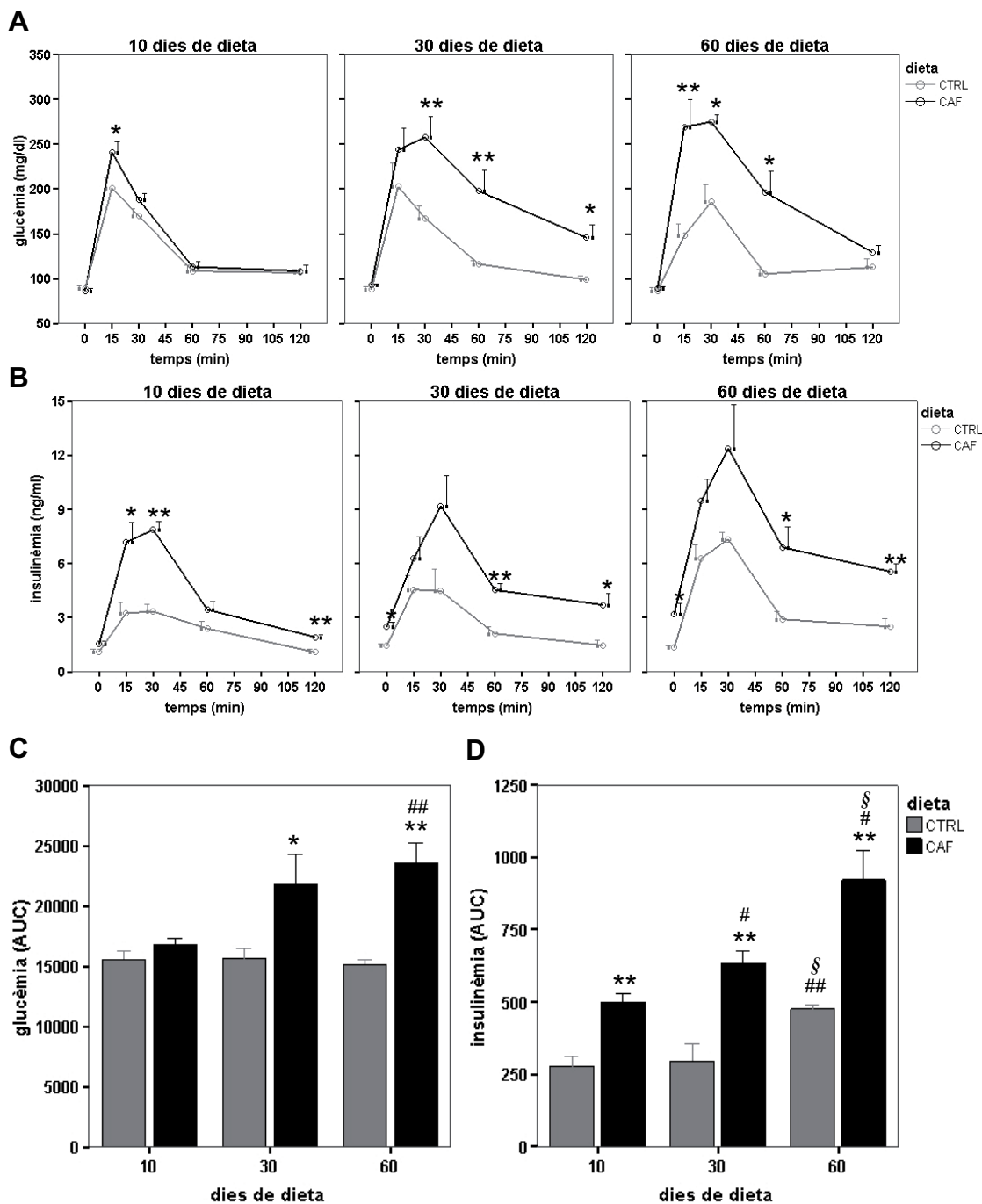
Per altra banda, tot i que en estat basal tots els grups experimentals es varen mantenir normoglucèmics (vegeu la figura 26A), en realitzar un test de tolerància a glucosa s'observà que el desenvolupament de l'obesitat s'associava a una intolerància a glucosa. Les rates de cafeteria mostraren valors majors tant de glucèmia com d'insulinèmia en el test, i aquesta alteració incrementà amb el temps de dieta (vegeu les figures 27A i 27B). Les diferències més evidents s'observaren en els valors d'insulinèmia, els quals ja es trobaven significativament incrementats després de 10 dies de dieta, com

demostren les àrees sota les corbes d'insulinèmia del test (vegeu la figura 27C). En canvi, als 10 dies de dieta la hiperglucèmia de les rates de cafeteria era molt lleugera i no es detectaren diferències significatives entre les àrees sota les corbes de glucèmia de rates control i de cafeteria fins als 30 dies de dieta (vegeu la figura 27D).

**FIGURA 26: Concentracions de diferents paràmetres bioquímics en estat basal.** Valors de glucèmia (A). Valors plasmàtics d'insulina (B) i d'àcids grassos lliures, NEFA (C). Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 a 10 animals per grup experimental. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test (per comparar CAF i CTRL) o una ANOVA (per comparar els diferents dies de dieta). \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$  comparat amb el grup de rates CTRL dels mateixos dies de dieta. #  $p < 0,05$  comparat amb el grup de rates de 10 dies de la mateixa dieta.



**FIGURA 27: Tests de tolerància a glucosa.** Corbes de glucèmia dels tests de tolerància a glucosa, IGTT (A) i valors de les àrees sota les mateixes (C). Corbes d'insulinèmia dels IGTT (B) i valors de les àrees sota les mateixes (D). Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 a 10 animals per grup experimental. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test (per comparar CAF i CTRL) o una ANOVA (per comparar diferents dies de dieta). \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$  comparat amb el grup de rates CTRL dels mateixos dies de dieta. #  $p < 0,05$  i ##  $p < 0,01$  comparat amb el grup de rates de 10 dies de la mateixa dieta. §  $p < 0,05$  comparat amb el grup de 30 dies de la mateixa dieta.



## 1.4. ESTUDI MORFOMÈTRIC DEL PÀNCREES

Els resultats obtinguts ens havien demostrat que l'administració de la dieta de cafeteria induïa obesitat, juntament amb intolerància a glucosa i hiperinsulinèmia. Aquesta hiperinsulinèmia podia ser deguda a una resposta per part de la cèl·lula beta tant de tipus funcional, en la qual s'incrementa la secreció d'insulina de cada cèl·lula beta, com morfològica, en la qual augmenta la massa total de cèl·lules beta. Atès que l'objectiu del nostre estudi se centrava en aquest últim tipus de resposta, ens calia comprovar que realment tenia lloc en el model d'obesitat que havíem escollit.

Per fer-ho, vàrem dur a terme una anàlisi morfològica del pàncrees en els 6 grups experimentals del nostre estudi, és a dir, sotmesos a una alimentació amb dieta estàndard o de cafeteria, durant 10, 30 o 60 dies. En 3 seccions diferents de cada pàncrees es mesuraren les àrees d'insulina i les de les seccions totals. Aquestes mesures ens van permetre d'una banda, calcular el percentatge d'àrea d'insulina i el nombre d'illots per àrea de pàncrees, i de l'altra, fer un estudi de la diferent distribució dels illots per la seva mida segons el grup experimental. Els valors corresponents a aquests paràmetres es troben agrupats en la taula 6 i també representats en les figures 28, 29 i 30.

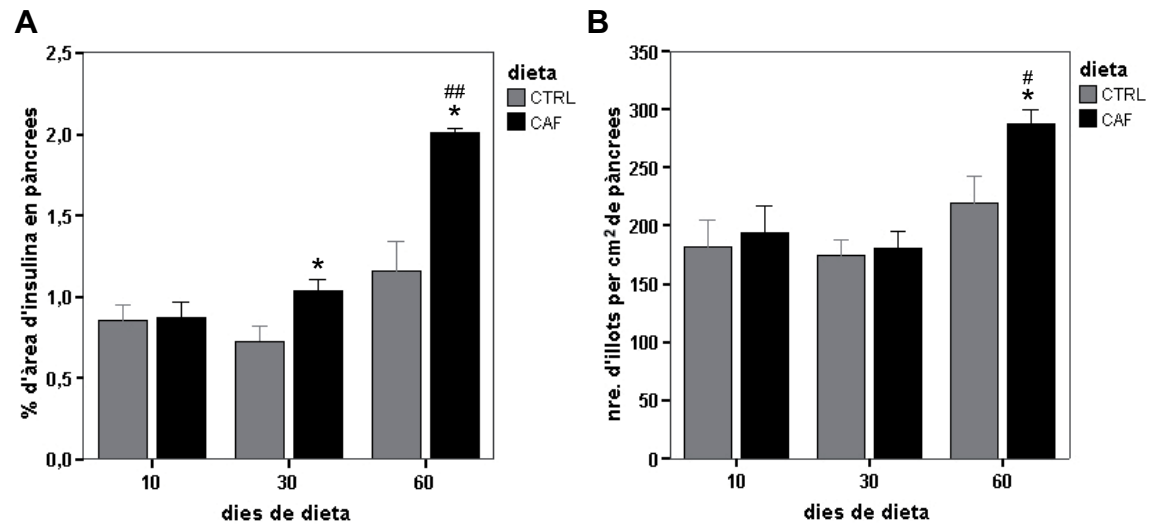
### Percentatge d'àrea d'insulina en pàncrees

El percentatge d'àrea d'insulina en pàncrees és un indicador que ha estat emprat en diversos estudis previs com a mesura indirecta de la massa de cèl·lula beta (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2001; Kubota *et al.*, 2000; Terauchi *et al.*, 2007). El vàrem calcular dividint la suma de les àrees d'insulina de tots els illots mesurats en les 3 seccions analitzades per les àrees totals d'aquestes seccions. Com es pot observar en la figura 28A, la dieta de cafeteria induïa un augment del percentatge d'àrea d'insulina en pàncrees. Tant als 30 com als 60 dies de dieta, el grup de dieta de cafeteria presentava un major percentatge d'àrea d'insulina que el de les rates control. Dins del grup de dieta de cafeteria, també s'observava un increment progressiu d'aquest paràmetre a mesura que avançava el temps.

Una vegada constatada l'existència d'una expansió de la massa de cèl·lula beta en el nostre model d'obesitat, el següent pas fou investigar quins eren els mecanismes que hi estaven implicats. La primera pregunta pel que fa als possibles mecanismes implicats que vàrem voler contestar fou si l'expansió era deguda a un augment en la mida o en el nombre d'illots.



**FIGURA 28: Percentatge d'àrea d'insulina en pàncrees (A) i nombre d'illots per àrea de pàncrees (B).** Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM d'entre 4 i 7 animals per grup experimental. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test (per comparar CAF i CTRL) o una ANOVA (per comparar diferents dies de dieta). \*  $p < 0,05$  comparat amb el grup de rates CTRL dels mateixos dies de dieta. ##  $p < 0,01$  comparat amb el grup de rates CAF de 10 dies de dieta.



### Nombre d'illots per àrea de pàncrees

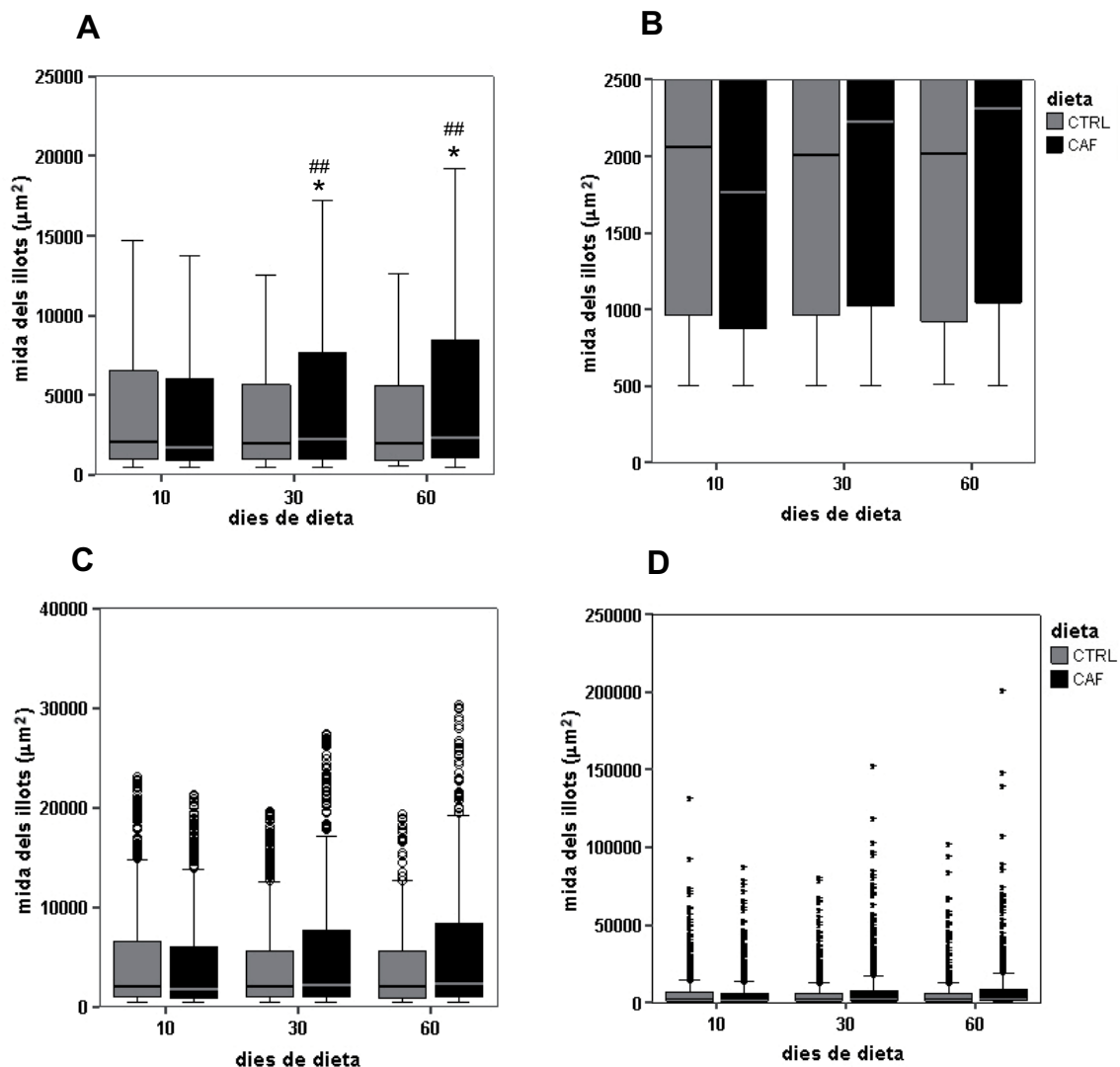
Tal com s'observa en la figura 28B, el nombre d'illots per àrea de pàncrees només fou significativament diferent entre les rates control i les de cafeteria als 60 dies de dieta. També als 60 dies de dieta, es va poder detectar un increment respecte als temps de dieta anteriors, tot i que només fou significatiu en el cas de les rates de cafeteria i respecte al grup de 10 dies de dieta.

### Distribució dels illots en funció de la seva mida

Aquest estudi es va fer a partir de les mesures dels illots de les 3 seccions analitzades prèviament, però desacartant els que mesuraven menys de  $500 \mu\text{m}^2$ , és a dir, els que estaven constituïts per agrupacions de menys de 5 cèl·lules (aquests últims foren analitzats per separat i considerats una mesura aproximada de la neogènesi). En la figura 29 es mostra la distribució per mida dels illots de cada grup, representada en diagrames de caixes. L'alçada de cada caixa representa l'amplitud interquartil (IQR), la qual inclou el 50% dels valors dels illots; la línia que es troba a l'interior de cada caixa indica la mediana (percentil 50) i els límits superior i inferior de la caixa representen el percentil 75 i 25 respectivament. Les línies verticals que parteixen de cada caixa senyalen l'1,5 IQR per

sobre o sota de la caixa i els valors que s'escapen d'aquests límits són els considerats atípics, quan es troben entre 1,5 i 3 IQRs, o extrems, quan es troben més enllà dels 3 IQRs (vegeu les figures 29C i 29D).

**FIGURA 29:** Distribució segons la mida, en diagrames de caixes, dels illots mesurats en l'estudi morfomètric. Es mostra la distribució dels illots en funció de la seva mida: sense incloure-hi els valors atípics o extrems (A), ampliant els quartils inferiors (B), incloent-hi els valors atípics (C) i incloent els valors atípics i els extrems (D). Es varen mesurar de 420 a 1190 illots per a cada condició experimental. Atès que les dades no seguien una distribució normal, varen ser analitzades estadísticament mitjançant tests no paramètrics: U de Mann-Whitney (per comparar CAF i CTRL) o test de Kruskal-Wallis (per comparar diferents dies de dieta). \*  $p < 0,05$  comparat amb el grup de rates CTRL del mateix temps de dieta. ##  $p < 0,01$  comparat amb el grup de rates CAF de 10 dies de dieta.

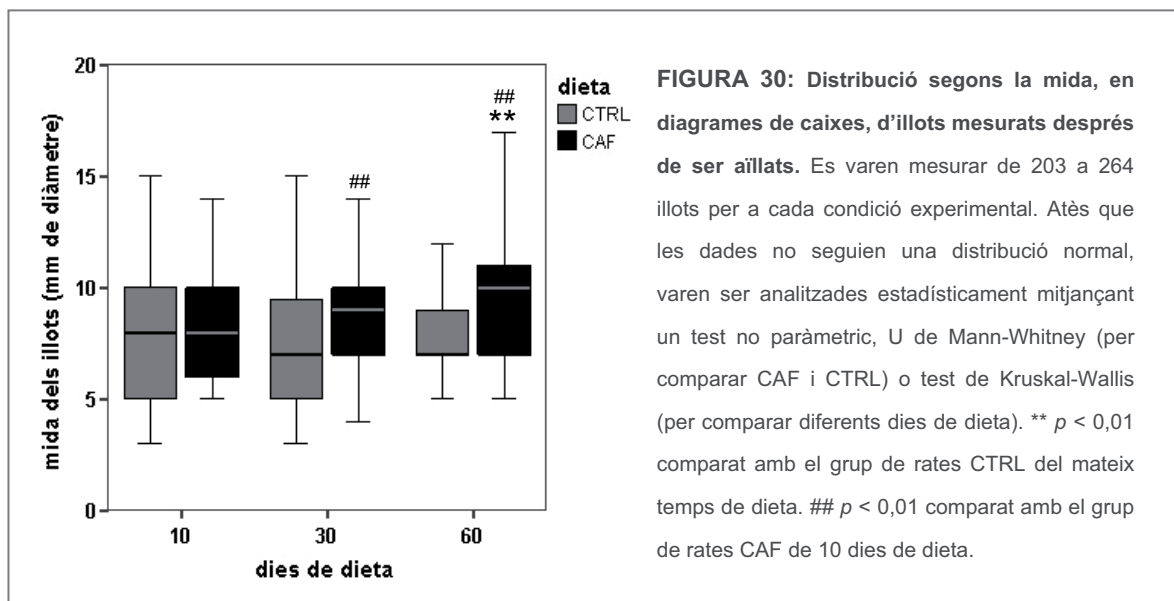


## Resultats

Com es pot observar en la figura 29, una característica comuna de tots els grups era que els illots de menor mida eren molt més abundants que els més grans, la qual cosa provocava una asimetria en les caixes. Aquesta, no és un tipus de distribució normal, i per això les dades s'analitzaren estadísticament mitjançant un test no paramètric. Es detectaren diferències significatives entre els illots de les rates obeses i primes de 30 i 60 dies de dieta. Dins de la categoria de les rates obeses, els illots de les de 30 i 60 dies eren també significativament diferents dels de les de 10 dies. Els grups de dieta de cafeteria mostraven medianes més elevades, i també es podia apreciar que per sobre de la mediana, l'amplitud de la caixa, de l'IQR 1,5 i dels valors atípics i extrems era major, cosa que demostrava que hi havia una major dispersió de la mostra cap a les mides d'illot més elevades.

El mesurament de l'àrea dels illots en seccions de pàncrees presenta l'inconvenient que sol infravalorar-ne la mida, ja que la secció no sempre talla l'illot pel seu punt de màxim diàmetre. Per aquest motiu vàrem voler fer un segon estudi emprant un mètode diferent, consistent a mesurar el diàmetre màxim dels illots una vegada aïllats i purificats mitjançant una lupa binocular. Els resultats d'aquesta anàlisi es mostren en la figura 30, on es pot apreciar que són força similars als de les mesures morfomètriques: s'observaven diferències significatives entre els mateixos grups, tot i que en aquest cas eren més acusades i es feien molt més evidents en les medianes.

En conclusió, els resultats de l'anàlisi morfològica del pàncrees ens indicaren que la dieta de cafeteria induïa una expansió de la massa de cèl·lula beta. Aquesta era causada en gran mesura, per un augment de la mida dels illots, i en menor grau, per un increment en el nombre d'illots, tot i que això últim només s'observava després de 60 dies de dieta.

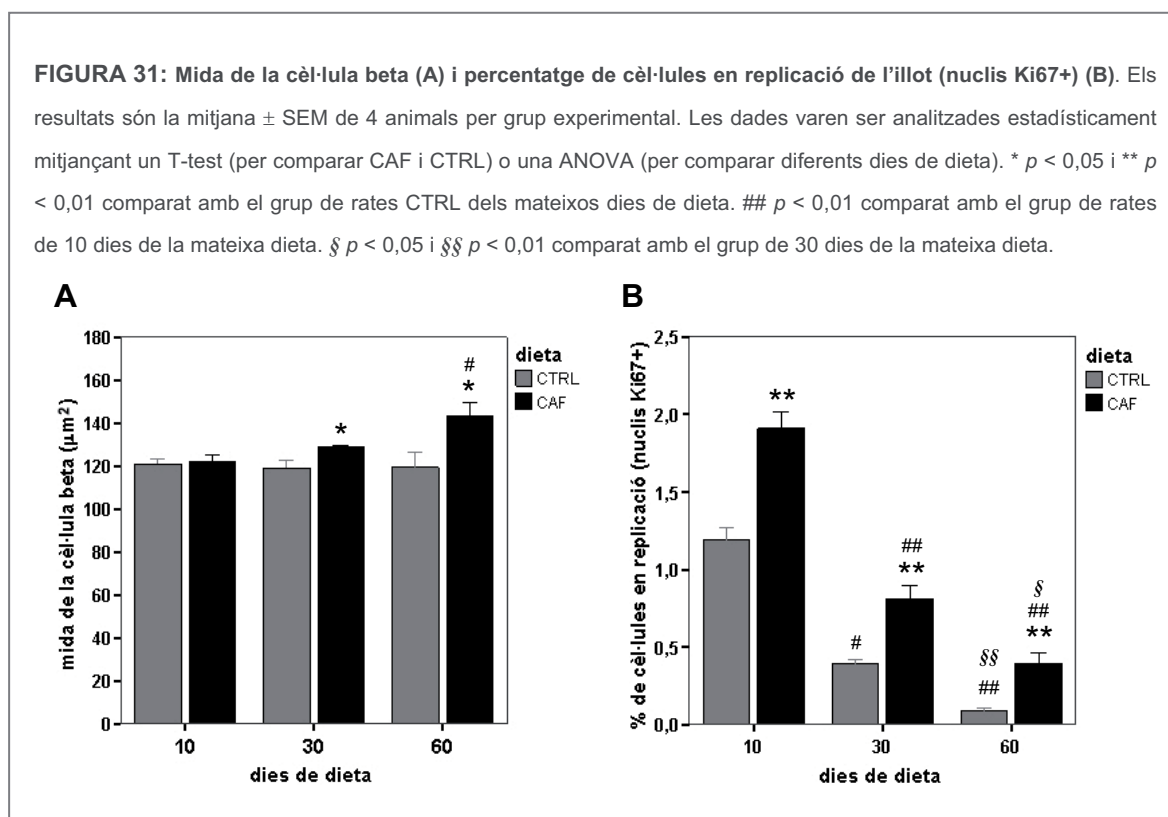


## 1.5. ESTUDI DE LA HIPERPLÀSIA I LA HIPERTRÒFIA DE LA CÈL·LULA BETA

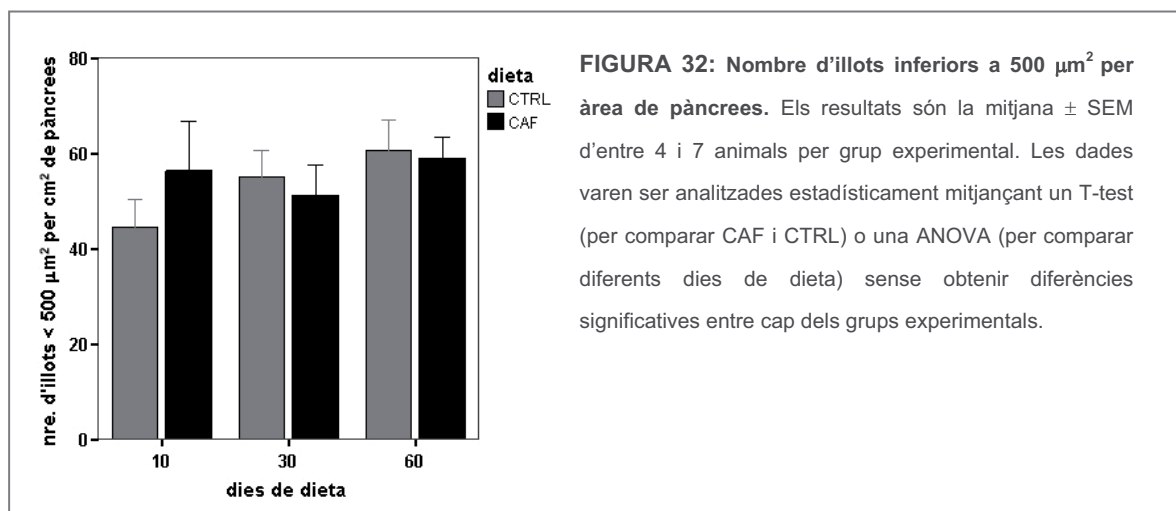
L'increment de la mida dels illots observat en el nostre model d'obesitat podia ser atribuït a una hipertròfia o a una hiperplàsia de la cèl·lula beta, fenòmens fan referència respectivament, a l'augment del nombre o de la mida de les cèl·lules.

Pel que fa a la hipertròfia, fou valorada en diferents seccions pancreàtiques de cada rata dels 6 grups experimentals, mesurant les àrees tenyides per insulina i comptant els nuclis del seu interior. A partir de la ràtio de l'àrea d'insulina pel nombre dels nuclis que s'hi van comptar, vàrem obtenir la mida de la cèl·lula individual. En la figura 31A es mostren els resultats i tant als 30 com als 60 dies de dieta, s'observa un lleuger però significatiu increment de la mida de la cèl·lula beta en els animals alimentats amb dieta de cafeteria.

La hiperplàsia la mesurarem mitjançant un estudi de la replicació en l'illot. Com es demostra en la figura 31B, la replicació disminueix considerablement al llarg del temps en ambdós grups dietètics, però sempre era més elevada en el grup de les rates de cafeteria que en el de les control.



Un altre possible mecanisme implicat en la hiperplàsia de la cèl·lula beta és la neogènesi, tot i que, segons s'ha descrit, la seva contribució a l'expansió de la població de cèl·lula beta en l'adult és menys important que la de la replicació (Dor *et al.*, 2004; Georgia i Bhushan, 2004; Teta *et al.*, 2007). Per aquest motiu no vàrem analitzar la neogènesi tan a fons com la replicació, i només realitzàrem una mesura del nombre d'agregats de cèl·lules beta inferiors a  $500 \mu\text{m}^2$ , els quals consideràrem illots de nova formació originats a partir de processos de neogènesi. Els resultats obtinguts no mostraren cap diferència entre els diferents grups experimentals, la qual cosa ens féu descartar una implicació important de la neogènesi en el procés d'expansió de la massa de cèl·lula beta del nostre model d'obesitat (vegeu la figura 32).

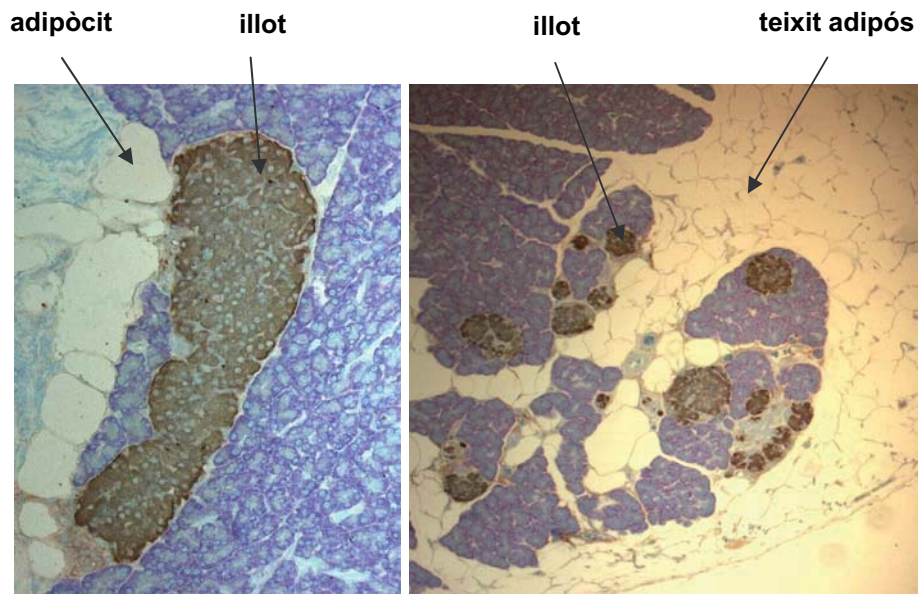


### 1.6. CONTACTE ENTRE EL TEIXIT ADIPÓS I ELS ILLOTS

En l'estudi gravimètric dels diferents dipòsits de teixit adipós, descrit en l'apartat 1.2, ja havíem pogut comprovar que les rates de cafeteria tenien una major quantitat de teixit adipós mesentèric envoltant el pàncrees (el qual havíem anomenat dipòsit pMES). Durant l'anàlisi morfològica dels pàncrees que vàrem realitzar posteriorment, també poguérem observar que, especialment en les rates obesas de 30 i 60 dies de dieta, aquest teixit adipós també es trobava infiltrant el pàncrees interiorment i entrant en contacte amb els illots (vegeu la figura 33).

Aquest fet reforçava encara més la nostra hipòtesi, en fer factible no només un possible efecte endocrí, sinó també paracrí, sobre la cèl·lula beta per part dels factors secretats pel teixit adipós.

**FIGURA 33: Contacte entre el teixit adipós i els illots.** Imatges de seccions de pàncrees de rates de 60 dies de dieta de cafeteria, on es mostra el contacte entre teixit adipós i illots. Les seccions foren tenyides per insulina amb la tècnica indirecta de la peroxidasa i contrastades amb blau de toluïdina.



TAULA 6: Dades obtingudes en l'anàlisi morfomètric del pàncrees i en l'estudi de la hipertròfia i la hiperplàsia de la cèl·lula beta.

	10 dies de dieta		30 dies de dieta		60 dies de dieta	
	CTRL	CAF	CTRL	CAF	CTRL	CAF
% d'àrea d'insulina en pàncrees	mitjana ± SEM	0,873 ± 0,105	0,727 ± 0,103	1,049 ± 0,078	1,271 ± 0,129	1,927 ± 0,024
nre. d'illots per àrea de pàncrees	mitjana ± SEM	181,324 ± 26,285	174,221 ± 13,865	180,470 ± 16,793	219,736 ± 28,822	286,617 ± 15,214
nre. d'illots < 500µm <sup>2</sup> per àrea de pàncrees	mitjana ± SEM	44,566 ± 6,375	55,095 ± 6,078	51,292 ± 7,106	60,536 ± 11,470	59,016 ± 5,542
% de cèl·lules de l'illot en replicació (% de nuclis Ki67 +)	mitjana ± SEM	1,118 ± 0,092	0,398 ± 0,028	0,814 ± 0,099	0,088 ± 0,027	0,397 ± 0,074
mida de la cèl·lula beta (µm <sup>2</sup> )	mitjana ± SEM	121,131 ± 2,930	119,343 ± 3,846	128,773 ± 1,069	119,445 ± 8163	143,470 ± 7,482
Distribució dels illots mesurats en la morfometria (µm <sup>2</sup> )	percentil 75	6524,79	5637,04	7708,51	5624,00	8428,00
	percentil 50	2055,76	2011,70	2229,08	2021,00	2316,00
	percentil 25	959,73	962,08	1020,83	923,00	1045,00

## 2. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA

### 2.1. EFECTE DEL MEDI CONDICIONAT DE TEIXIT ADIPÓS DE DIFERENTS DIPÒSITS SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA LÍNIA DE CÈL·LULA BETA INS1E

En la caracterització del nostre model d'obesitat havíem comprovat que no arribava a desenvolupar diabetis, tot i que sí manifestava una certa intolerància a glucosa, sobretot a partir dels 30 dies de dieta. Tant a nivell basal com en el test d'intolerància a glucosa, les rates de cafeteria mostraven una hiperinsulinèmia que després vàrem demostrar que s'aconseguia, almenys en part, mitjançant una expansió de la massa de cèl·lula beta.

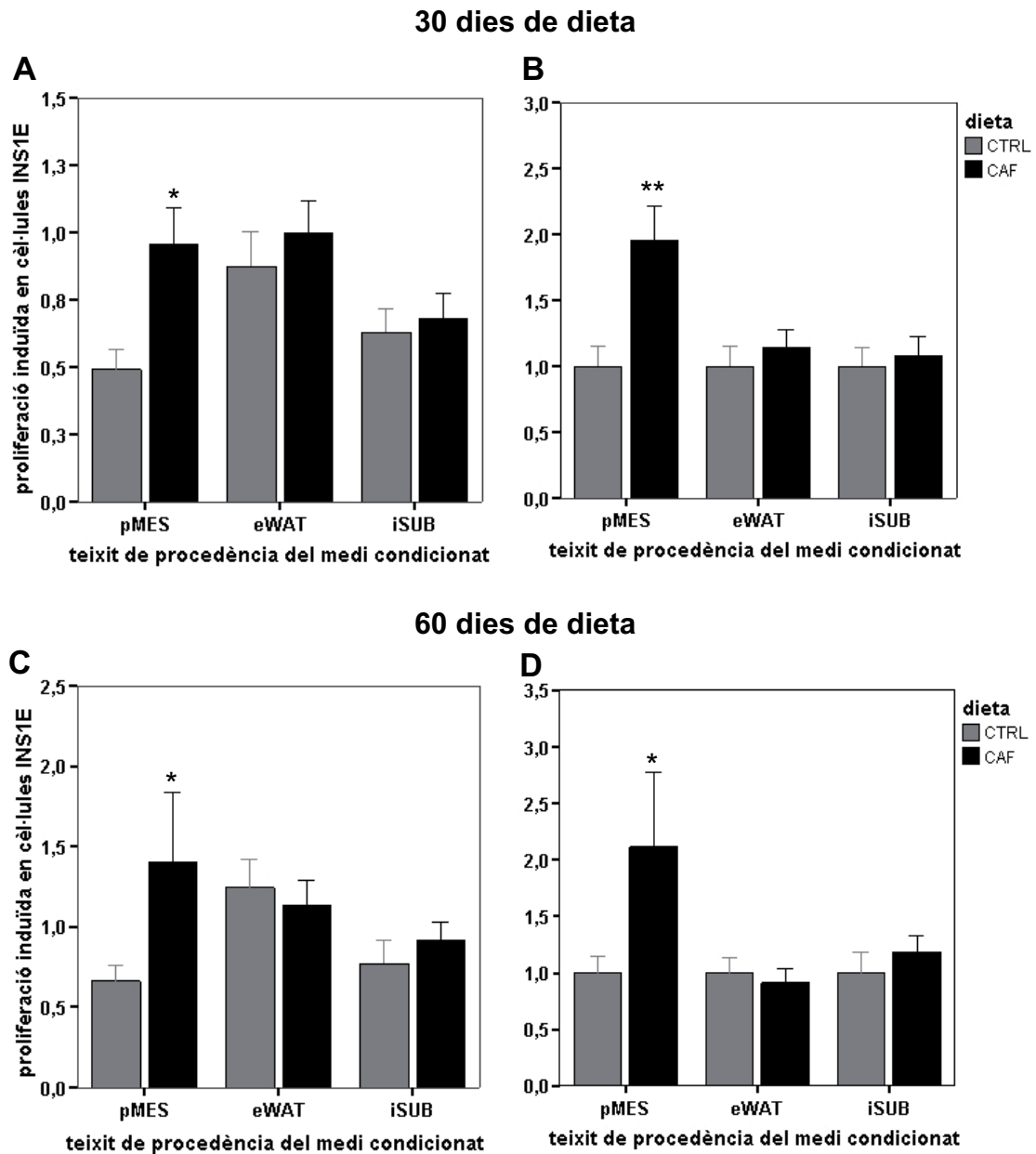
A partir d'aquests resultats vàrem concloure que el model de rata de cafeteria era adequat per dur a terme l'objectiu del nostre estudi, és a dir, determinar si l'expansió de la massa de cèl·lula beta que es dona en l'obesitat és mitjançada per factors secretats pel teixit adipós. Per fer-ho, vàrem dissenyar un experiment *in vitro* en el qual mesurarem la proliferació induïda en una línia de cèl·lules beta, les INS1E, per diferents "medis condicionats" que havien estat prèviament incubats amb teixits adiposos i per tant, contenen els factors secretats per aquests. En la figura 34 es mostren els resultats d'aquests experiments.

Per a l'obtenció dels medis condicionats vàrem emprar teixits de rates obeses i controls pertanyents als dos períodes de dieta en els quals havíem observat majors diferències entre aquests dos grups, és a dir, de 30 i 60 dies. Vàrem considerar que seria interessant estudiar l'efecte de diferents dipòsits de teixit adipós tenint en compte que, segons s'ha demostrat en nombrosos estudis (Kershaw i Flier, 2004), aquests difereixen en les seves propietats tant secretores com metabòliques. En vàrem escollir 3, el pMES, l'eWAT i l'iSUB, els quals, després de ser extrets, foren lleugerament esmicolats i immediatament incubats en els medis per tal d'alterar el mínim el seu patró de secreció.

Com es pot observar en la figura 34, la proliferació induïda en les cèl·lules INS1E pels medis condicionats procedents de rates obeses o primes només diferia en un tipus de teixit, el pMES. El medi de teixit pancreàtic mesentèric induïa una major proliferació en les cèl·lules INS1E, aproximadament el doble, quan procedia de rates obeses que quan s'obtenia de rates control. Aquest patró de proliferació s'observà emprant medis condicionats procedents tant de rates de 30 dies, com de 60 dies de dieta.



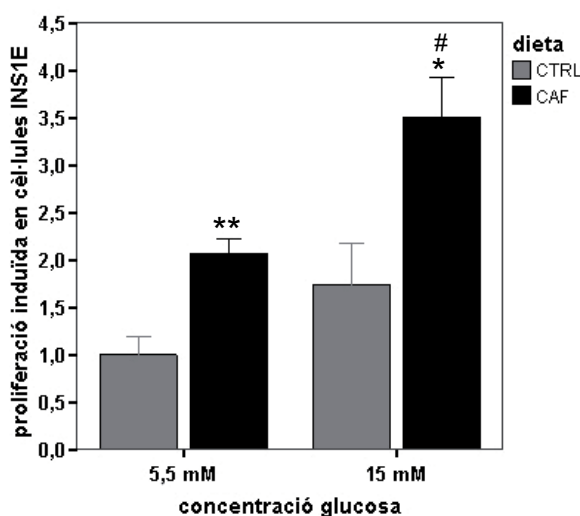
**FIGURA 34: Proliferació induïda en cèl·lules INS1E per medis condicionats procedents de diferents dipòsits de teixit adipós.** Proliferació induïda per medis condicionats procedents de diferents teixits adiposos de rates de 30 dies (A i B) o 60 dies (C i D) de dieta. En tots els casos la proliferació induïda pels medis condicionats està normalitzada respecte a la d'un medi no condicionat que es va incloure en cada experiment, i en B i D, a més, també s'ha normalitzat respecte a la proliferació mitjana induïda pels medis condicionats de les rates control. Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 a 6 experiments, cadascun realitzat amb medis condicionats procedents d'animals diferents. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test. \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$  comparat amb el grup de les rates CTRL.



## 2.2. EFECTE DEL MEDI CONDICIONAT DE TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES INS1E A DIFERENTS CONCENTRACIONS DE GLUCOSA

Tal com ja s'ha comentat en la introducció, l'acció d'alguns factors de creixement pels quals ha estat descrit un efecte sobre la proliferació de la cèl·lula beta (Igf1 o Gh) és dependent de glucosa (Cousin *et al.*, 1999; Hugl *et al.*, 1998). Per aquest motiu, ens va semblar interessant determinar si els efectes del medi pMES sobre la proliferació de les cèl·lules INS1E canviaven en modificar-ne la concentració de glucosa. En la figura 35 es mostra la proliferació induïda pel medi condicionat pMES, ajustant la seva concentració final de glucosa a 5,5 o 15mM. En primer lloc, observarem que, tal com ha estat descrit anteriorment, la glucosa mostrava un efecte positiu sobre la proliferació per si sola. No obstant això, l'efecte del medi pMES no semblava veure's potenciat per la glucosa, ja que l'increment de proliferació provocat pel medi de rates obesas respecte al de les rates control, aproximadament del doble, era el mateix a baixa que a alta concentració de glucosa.

**FIGURA 35:** Efecte de la concentració de glucosa en la proliferació induïda en cèl·lules INS1E pel medi condicionat pMES de rates de 30 dies de dieta. Es mostra la proliferació induïda per cada medi condicionat normalitzada respecte de la proliferació mitjana induïda pels medis de les rates control a 5,5 mM de glucosa. Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 6 experiments, cadascun realitzat amb medis condicionats procedents d'animals diferents. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test. \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$  comparat amb el grup de rates CTRL. #  $p < 0,05$  comparat amb 5,5 mM de glucosa.



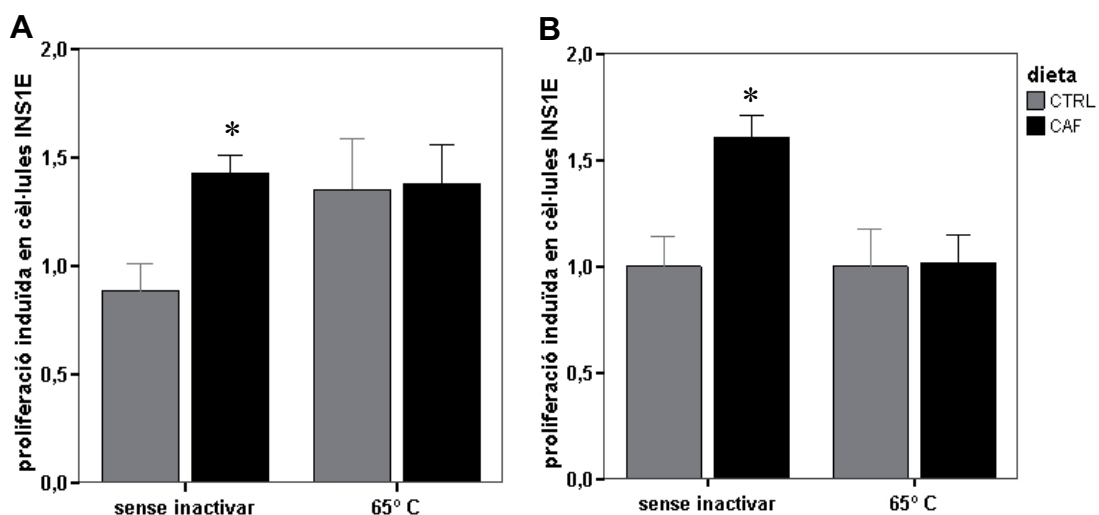
### 2.3. EFECTE DE LA DESACTIVACIÓ PER CALOR DEL MEDI CONDICIONAT DE TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ INDUÏDA EN LES CÈL·LULES INS1E

A continuació, per tal d'estudiar les propietats dels possibles factors implicats en els efectes del medi condicionat pMES, vàrem dur a terme un experiment per comprovar si aquests efectes es mantenen després de desactivar el medi condicionat mitjançant calor (10 min a 65 °C).

En la figura 36 es pot observar que la desactivació per calor del medi condicionat pancreàtic mesentèric abolia els seus efectes sobre la proliferació de les cèl·lules INS1E; en canvi, el medi intacte seguia induint el doble de proliferació quan procedia de rates obesas que quan s'obtenia de rates control, tal com havíem vist en els experiments anteriors. Aquest resultat ens va suggerir que el factor que estàvem buscant era possiblement una proteïna, a causa de la termolabilitat que presentava.

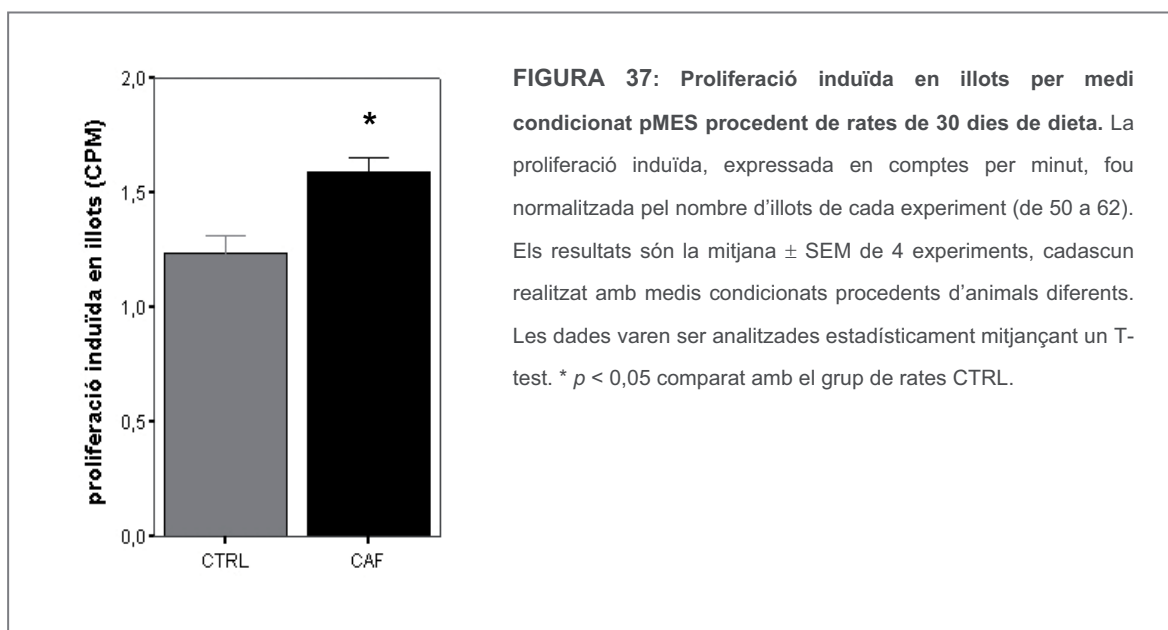
Una altra observació sorgida arran d'aquests experiments fou que la desactivació no semblava afectar a la proliferació induïda pel medi condicionat de les rates de cafeteria, sinó que era el medi obtingut de les rates control el que induïa una major proliferació en ser desactivat (vegeu la figura 36A). Aquest fet semblava indicar que el possible factor mediador dels efectes observats actuava com un inhibidor de la proliferació, i reduïa les propietats proliferatives del medi condicionat control en ser més abundant en aquest que en el de cafeteria.

**FIGURA 36:** Efecte de la desactivació per calor del medi condicionat pMES sobre la proliferació induïda en cèl·lules INS1E. En tots els casos la proliferació induïda pels medis condicionats està normalitzada respecte a la d'un medi no condicionat que es va incloure en cada experiment, i en B, a més, també s'ha normalitzat respecte a la proliferació mitjana induïda pels medis de les rates controls. Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 experiments, cadascun realitzat amb medis condicionats procedents d'animals diferents. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test. \*  $p < 0,05$  comparat amb el grup de rates CTRL.



## 2.4. PROLIFERACIÓ INDUÏDA EN ILLOTS PER MEDI CONDICIONAT DE TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC

En els experiments anteriors s'havia emprat la línia cel·lular INS1E com a model de cèl·lula beta, la qual conserva un fenotip de cèl·lula beta ben diferenciat, i a més, té una elevada taxa de replicació que permet detectar fàcilment els canvis en la proliferació induïda. No obstant això, en tractar-se d'una línia cel·lular i no d'un cultiu primari, les cèl·lules INS1E representaven un model poc fisiològic. Per aquest motiu, també vàrem voler comprovar les accions del medi condicionat pMES sobre la proliferació d'illots pancreàtics de rata. En els nostres experiments vàrem emprar illots de rata adulta, d'unes 8 setmanes d'edat, i tot i que el seu índex de proliferació era més aviat baix, ja hi vàrem poder detectar un increment d'aquest índex en els cultivats amb medi procedent de rates de cafeteria respecte als tractats amb medi de rates control (vegeu la figura 37).



### 3. CERCA DE GENS CANDIDATS RESPONSABLES DE L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA

Una vegada demostrats els efectes del medi condicionat pMES sobre la proliferació de la cèl·lula beta, el següent objectiu que ens proposàrem fou identificar els possibles factors responsables d'aquests efectes. Per fer-ho vàrem dur a terme un procés de selecció basant-nos en les condicions que, *a priori*, consideràvem que havien d'acomplir els factors candidats. Aquestes condicions i el mètode que s'emprà per fer cada selecció es mostren en la taula 7. Els resultats obtinguts es descriuen en els apartats següents.

TAULA 7: Passos seguits per a la cerca de gens candidats responsables de l'efecte del teixit adipós pancreàtic mesentèric sobre la proliferació de la cèl·lula beta.

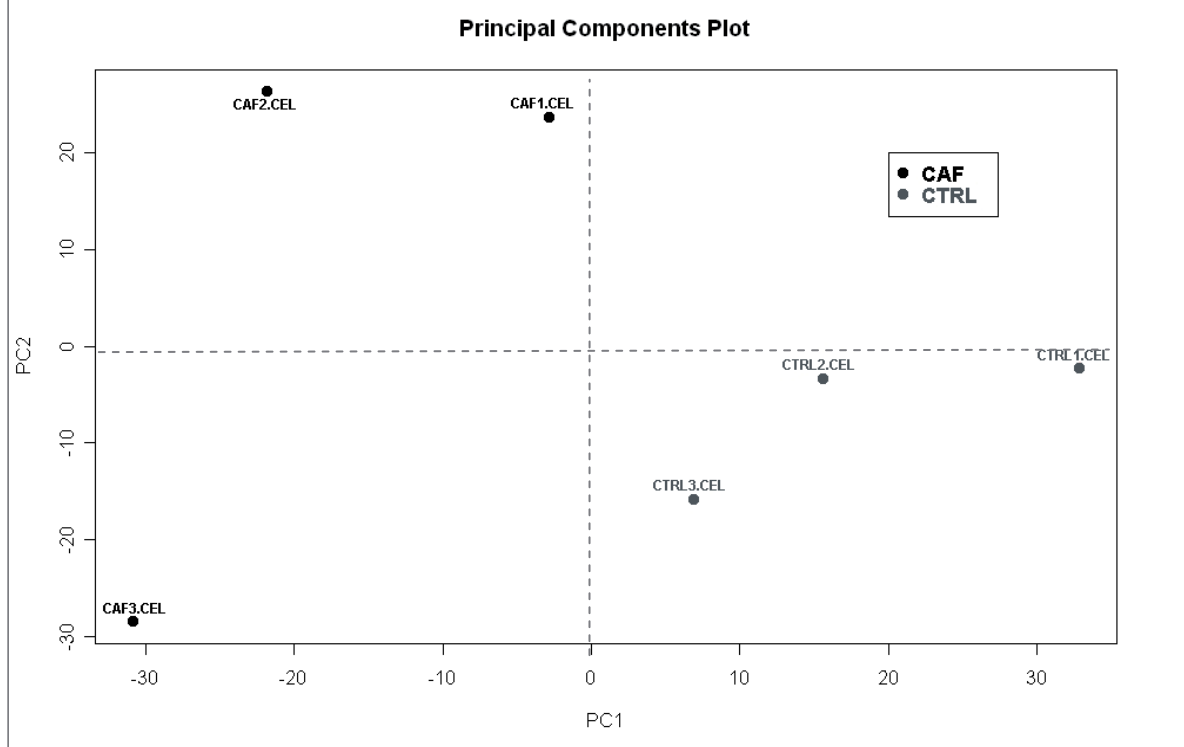
Ordre de selecció	Apartat on es descriu	Condicció a complir	Mètode de selecció
1	3.1	Expressió diferencial entre rates control i de cafeteria en teixit adipós pMES.	Estudi de l'expressió gènica de teixit adipós pMES de rates control i de cafeteria mitjançant la tecnologia dels microarrays.
2	3.2	Codificació per a una proteïna secretable.	Estudi de la presència o absència del pèptid senyal mitjançant el programa SignalP V3.
3	3.2	Implicació en processos de proliferació prèviament descrita.	Cerca bibliogràfica de cada gen.
4	3.3	Expressió diferencial entre rates control i de cafeteria <b>exclusiva</b> de teixit pMES.	Estudi de l'expressió gènica en teixit adipós pMES, eWAT i iSUB de rates control i de cafeteria mitjançant PCR quantitativa.

### 3.1. CERCA DE GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS ENTRE RATES CONTROL I DE CAFETERIA EN TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC

Els resultats obtinguts ens havien mostrat que la inducció de la proliferació de la cèl·lula beta per part del medi condicionat pMES era diferent quan aquest procedia de rates control o obeses (vegeu la figura 34). Per aquest motiu, la primera selecció que vàrem dur a terme fou la dels gens l'expressió dels quals en el teixit pMES fos també diferent entre rates control i de cafeteria. Per realitzar aquest estudi vàrem emprar la tecnologia dels microarrays: es varen hibridar 6 microarrays amb RNA procedent de teixit adipós pancreàtic mesentèric de 3 rates control i 3 rates de cafeteria, en ambdós casos, de 35 dies de dieta. Els microarrays hibridats foren els RAE230 2.0 de la casa comercial Affymetrix que permeten analitzar l'expressió de 31042 gens de rata.

Les dades obtingudes de cada microarray hibridat foren sotmeses a un seguit de controls de qualitat, els quals s'acompliren perfectament, descartant així qualsevol anomalia d'origen tècnic que pogués alterar els resultats (vegeu l'apartat 9 de material i mètodes). No obstant això, l'anàlisi posterior de les dades d'expressió ens va portar a descartar un dels microarrays, l'hibridat amb l'RNA de la rata de cafeteria 3, a causa de la detecció de certes anomalies d'origen biològic que es descriuen a continuació.

**FIGURA 38:** Representació gràfica en dos components principals de les dades d'expressió obtingudes en cadascun dels 6 microarrays hibridats.



## Resultats

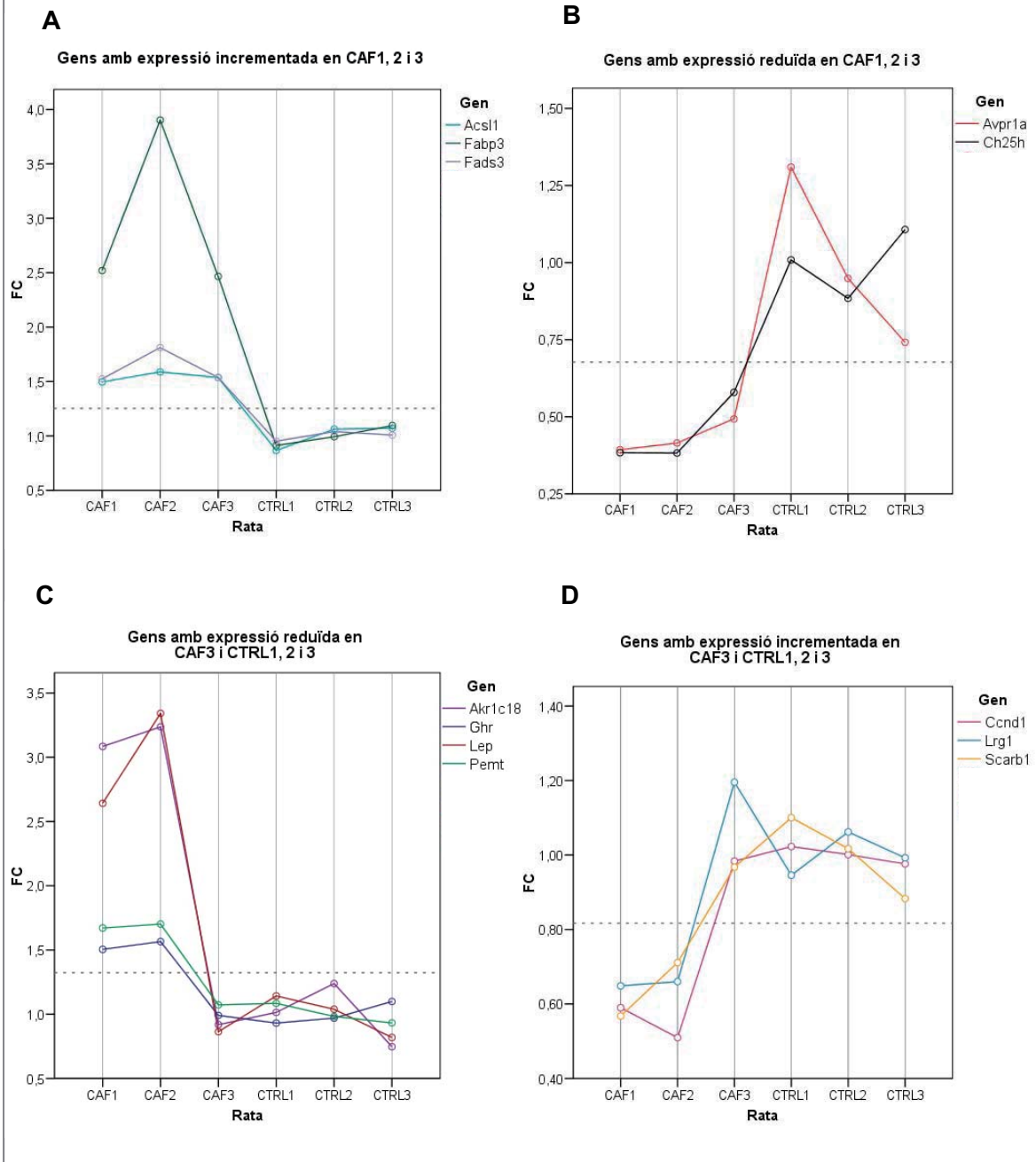
En la figura 38 es mostra la representació de les dades d'expressió obtingudes de cada microarray en dos components principals. Tal com s'hi pot observar, els microarrays de les tres rates control es troben concentrats en un mateix quadrant, fet que denota la seva homogeneïtat. En el cas dels microarrays de les rates de cafeteria només dos, l'1 i el 2, es troben relativament propers i a dins d'un mateix quadrant. En canvi, el de la rata de cafeteria 3 està separat de tots els altres, tant dels altres dos de cafeteria com dels controls, en un tercer quadrant.

Aquesta desviació del microarray de la rata de cafeteria 3 en la representació per components principals ens va fer sospitar que aquesta rata podria presentar unes característiques mixtes entre les rates control i les altres dues rates de cafeteria. Per comprovar aquesta possibilitat vàrem comparar els patrons d'expressió de diferents gens relacionats amb obesitat, teixit adipós o metabolisme lipídic en les 6 rates analitzades (vegeu la figura 39).

Tal com es pot observar en les figures 39A i 39B, per a 5 d'aquests gens, l'expressió de la rata de cafeteria 3 era similar a la de les altres dues del seu grup i mostrava canvis significatius respecte a la de les rates control. D'aquests 5 gens, 3 eren induïts (*Acs11*, *Fabp3* i *Fads3*) (figura 39A) i 2 reprimits (*Avpr1a* i *Ch25h*) (figura 39B) per la dieta de cafeteria. Tanmateix, també detectàrem 8 gens en els quals el patró d'expressió de la rata de cafeteria 3 es corresponia amb el de les rates control i era significativament diferent al de les altres dues rates de cafeteria. En aquest cas, l'expressió en les rates de cafeteria 1 i 2 es trobava incrementada respecte a la de la rata de cafeteria 3 i a la de les control en 4 dels 8 gens (*Akr1c18*, *Ghr*, *Lep* i *Pemt*) (figura 39C), i reduïda en els restants (*Ccnd1*, *Ch25h*, *Lrg1* i *Scarb1*) (figura 39D).

Aquests resultats ens confirmaren que, efectivament, la rata de cafeteria 3 no presentava unes característiques clares i ben definides de rata obesa, motiu pel qual vàrem decidir excloure-la de l'estudi. Així doncs, l'anàlisi final dels microarrays es va dur a terme comparant els microarrays de les rates de cafeteria 1 i 2 amb els de les 3 rates control. En aquesta anàlisi s'obtingueren 213 gens diferencialment expressats, dels quals 137 eren gens identificats (vegeu la taula de l'annex). D'aquests, 68 eren induïts i 69 reprimits per la dieta de cafeteria.

**FIGURA 39: Gens relacionats amb metabolisme lipídic o teixit adipós amb canvis significatius obtinguts en l'anàlisi d'expressió gènica per microarrays.** Es mostren els perfils d'expressió dels gens obtinguts després de la comparació estadística entre les 3 rates CTRL i les 3 rates CAF (A i B) o entre el grup de les rates CTRL, incloent-hi la rata CAF3, i el grup de les altres dues rates CAF (C i D). La relació de cada gen amb obesitat, teixit adipós o metabolisme lipídic fou establerta a partir de la base de dades Gene Ontology.





### 3.2. SELECCIÓ DE GENS QUE CODIFQUEN PER A PROTEÏNES SECRETABLES I IMPLICADES EN PROCESSOS DE PROLIFERACIÓ

De la llista total de gens diferencialment expressats, obtinguts en l'anàlisi dels microarrays, vàrem fer una selecció dels que codificaven per a proteïnes potencialment secretables. Per fer-ho empràrem el software SignalP 3.0 Server de la pàgina web ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org>) de l'Institut Suís de Bioinformàtica, el qual prediu la presència del pèptid senyal en una determinada seqüència proteica. En la figura 40 es llisten els 26 gens que segons aquesta anàlisi codificaven per a proteïnes que contenien el pèptid senyal i que, per tant, es podien considerar secretables. També es mostra el seu patró d'expressió en cada microarray (*heat diagram*) i el seu *Fold Change* (FC), és a dir, la seva ràtio d'expressió entre el grup de rates de cafeteria i el de rates control. Com es pot observar, aquesta ràtio és positiva en 11 dels gens (la seva expressió incrementa en administrar la dieta de cafeteria) i negativa en els 15 restants (la seva expressió es reduïda per la dieta de cafeteria).

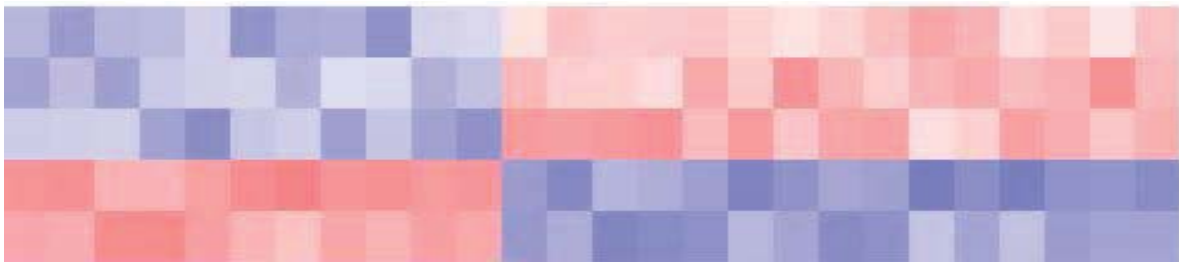
A continuació, basant-nos en una cerca bibliogràfica, vàrem poder relacionar 10 dels 26 gens que codificaven per a proteïnes secretables amb processos de proliferació cel·lular. Les referències bibliogràfiques en les quals es descriu aquesta relació s'indiquen en la figura 40, així com l'efecte sobre la proliferació de cada gen, promotor (+) o bé inhibidor (-), que se'n dedueix. Aquests gens i els seus efectes més rellevants també els descrivim més extensament en l'apartat de la discussió.

Els perfils d'expressió dels 10 gens seleccionats com a implicats en processos de proliferació obtinguts en l'anàlisi dels microarrays es mostren en la figura 41: en 5 d'ells l'expressió en les rates de cafeteria incrementava (*Cgref1*, *Fgf18*, *Ghr*, *Lep* i *Sfrp4*) i en els altres 5 disminuïa (*Clu*, *Egfl7*, *Gdf10*, *Igfbp3* i *Ptn*).

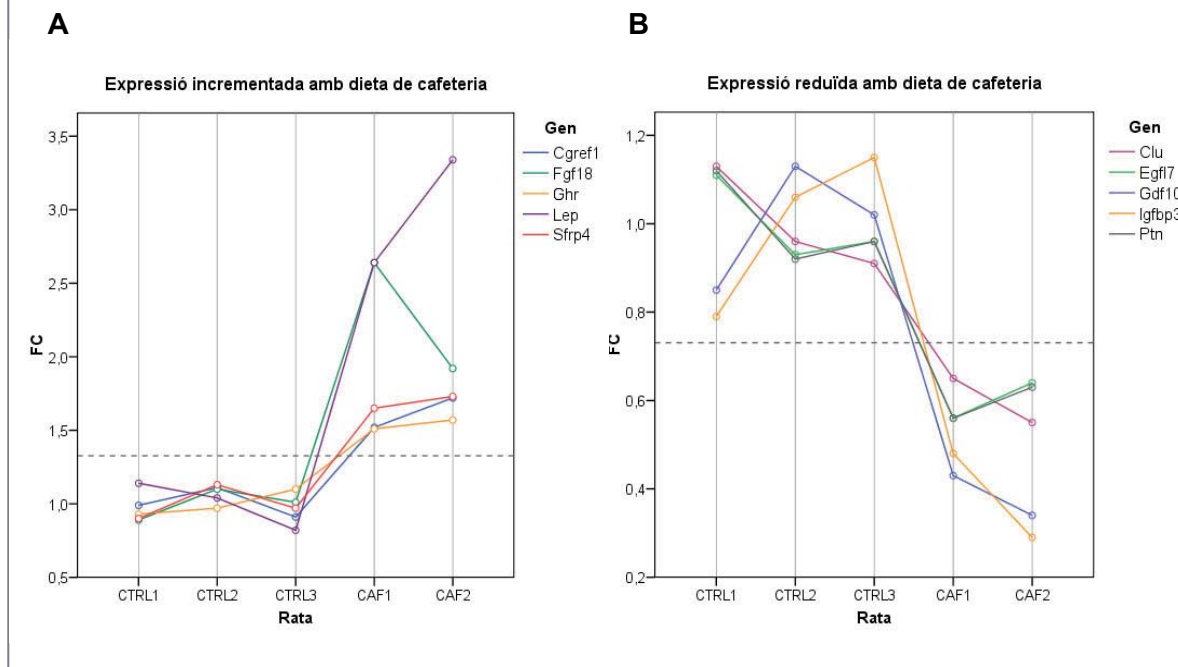
**FIGURA 40:** Gens obtinguts a partir de l'anàlisi dels microarrays, amb expressió diferencial en teixit pMES entre rates control i de cafeteria, i que codifiquen per a proteïnes secretables. A l'esquerra de la taula es representa l'expressió de cada gen, incrementada (en vermell) o reduïda (en blau), en cadascun dels microarrays per mitjà d'un *heat diagram*. Es marquen en gris els gens implicats en processos de proliferació, indicant les referències en les que es descriu aquesta implicació i si actuen com a promotors (+) o bé inhibidors (-) de la proliferació. FC (*Fold Change*): ràtio d'expressió entre el grup de rates CAF i el de rates CTRL.

Abreviació del gen	Nom complet del gen	Codi d'identificació	FC	Efecte	Referències
Grifin	galectin-related inter-fiber protein	NM_057187	3,55		
<i>Lep</i>	<i>leptin</i>	NM_013076	3,01	+	(Garofalo i Surmacz, 2006; Islam et al., 1997; Tanabe et al., 1997)
<i>Obp3</i>	<i>alpha-2u globulin PGCL4</i>	AB039825	2,23		
<i>Fgf18</i>	<i>fibroblast growth factor 18</i>	NM_019199	2,09	+	(Haque et al., 2007; Hu et al., 1998)
<i>Crtf1</i>	<i>cytokine receptor-like factor 1</i>	AA925924	1,88		
<i>Mmp23</i>	<i>matrix metalloproteinase 23</i>	AI548892	1,88		
<i>Mfap5</i>	<i>microfibrillar associated protein 5</i>	BI283094	1,75		
<i>Sfrp4</i>	<i>secreted frizzled-related protein 4</i>	AF140346	1,64	-	(Kawano i Kypta, 2003; Schinner et al., 2009; Welters i Kulkarni, 2008)
<i>Cgref1</i>	<i>cell growth regulator with EF hand domain 1</i>	U66470	1,61	-	(Madden et al., 1996)
<i>Ghr</i>	<i>growth hormone receptor</i>	AI170771	1,54	-	(Clark et al., 1996; Edens i Talamantes, 1998; Liu et al., 2004; Mannor et al., 1991; Parsons et al., 1995)
<i>Tex264</i>	<i>testis expressed gene 264</i>	AW252660	1,54		
<i>Jam3</i>	<i>junctional adhesion molecule 3</i>	AA998207	-1,51		
<i>Ccl19</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 19</i>	AA996885	-1,54		
<i>Egfl7</i>	<i>EGF-like domain 7</i>	AF223678	-1,57	- / +	(Parker et al., 2004; Schmidt et al., 2009)
<i>Ptin</i>	<i>pleiotrophin</i>	NM_017066	-1,58	+	(Chauhan et al., 1993; Fang et al., 1992; Perez-Pinera et al., 2008)
<i>Eltf1</i>	<i>EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1</i>	NM_022294	-1,63		
<i>Clu</i>	<i>clusterin</i>	AF314657	-1,67	+	(Kim et al., 2001; Kim et al., 2007; Min et al., 2003; Shannan et al., 2006)
<i>RT1-Db1</i>	<i>RT1 class II, locus Db1</i>	BI279526	-1,67		
<i>Mpz1</i>	<i>myelin protein zero-like 1</i>	BM384017	-1,71		
<i>Aqp1</i>	<i>aquaporin 1</i>	AA891661	-1,92		
<i>Igfbp3</i>	<i>insulin-like growth factor binding protein 3</i>	AI713966	-2,59	-	(Chen i Ferry, 2006; Shim et al., 2004; Yamada i Lee, 2009)
<i>Gdf10</i>	<i>growth differentiation factor 10</i>	NM_024375	-2,62	-	(Dai et al., 2001; Dai et al., 2004)
<i>Cp</i>	<i>ceruloplasmin</i>	NM_012532	-2,94		
<i>RT1-Aw2</i>	<i>RT1 class II, locus Aw2</i>	L40362	-3,24		
<i>Ccl11</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 11</i>	NM_019205	-3,96		
<i>RT1-Bb</i>	<i>RT1 class II, locus Bb</i>	BM389513	-17,49		

CAFI  
CAF2  
CTRL1  
CTRL2  
CTRL3



**FIGURA 41:** Gens que codifiquen per a proteïnes secretables, implicats en processos de proliferació i amb canvis significatius obtinguts en l'anàlisi d'expressió gènica per microarrays. Es mostren els perfils d'expressió gènica de cada gen obtinguts en l'anàlisi per microarrays separant els gens segons si la seva expressió es troba incrementada (A) o reduïda (B) en les rates CAF.



### 3.3. SELECCIÓ DE GENS AMB EXPRESSIÓ GÈNICA DIFERENCIAL ENTRE RATES CONTROL I DE CAFETERIA EXCLUSIVA DE TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC

La última condició que ens calia comprovar en cadascun dels factors secretats i implicats en processos de proliferació prèviament seleccionats era que l'expressió diferencial d'aquests entre rates control i obesas fos exclusiva del teixit adipós pMES. Aquest requisit es basava en fet que el teixit adipós pMES era l'únic, el medi condicionat del qual, mostrava un efecte diferent quan procedia de rates control que quan s'obtenia de rates obesas (vegeu la figura 34). Aquesta selecció final va consistir a recomprovar l'expressió diferencial dels gens candidats en teixit pMES i descartar-la en primer lloc en teixit eWAT, i en segon lloc en l'iSUB, mitjançant PCR quantitativa.

En 5 dels 10 gens estudiats els resultats obtinguts per PCR quantitativa en teixit pMES no confirmaren els dels microarrays i, per tant, foren exclosos: *Cgref1*, *Egfl7*, *Fgf18*, *Gdf10* i *Ptn* (vegeu les figures 42A – 42E). Els gens *Clu* i *Lep* (vegeu les figures

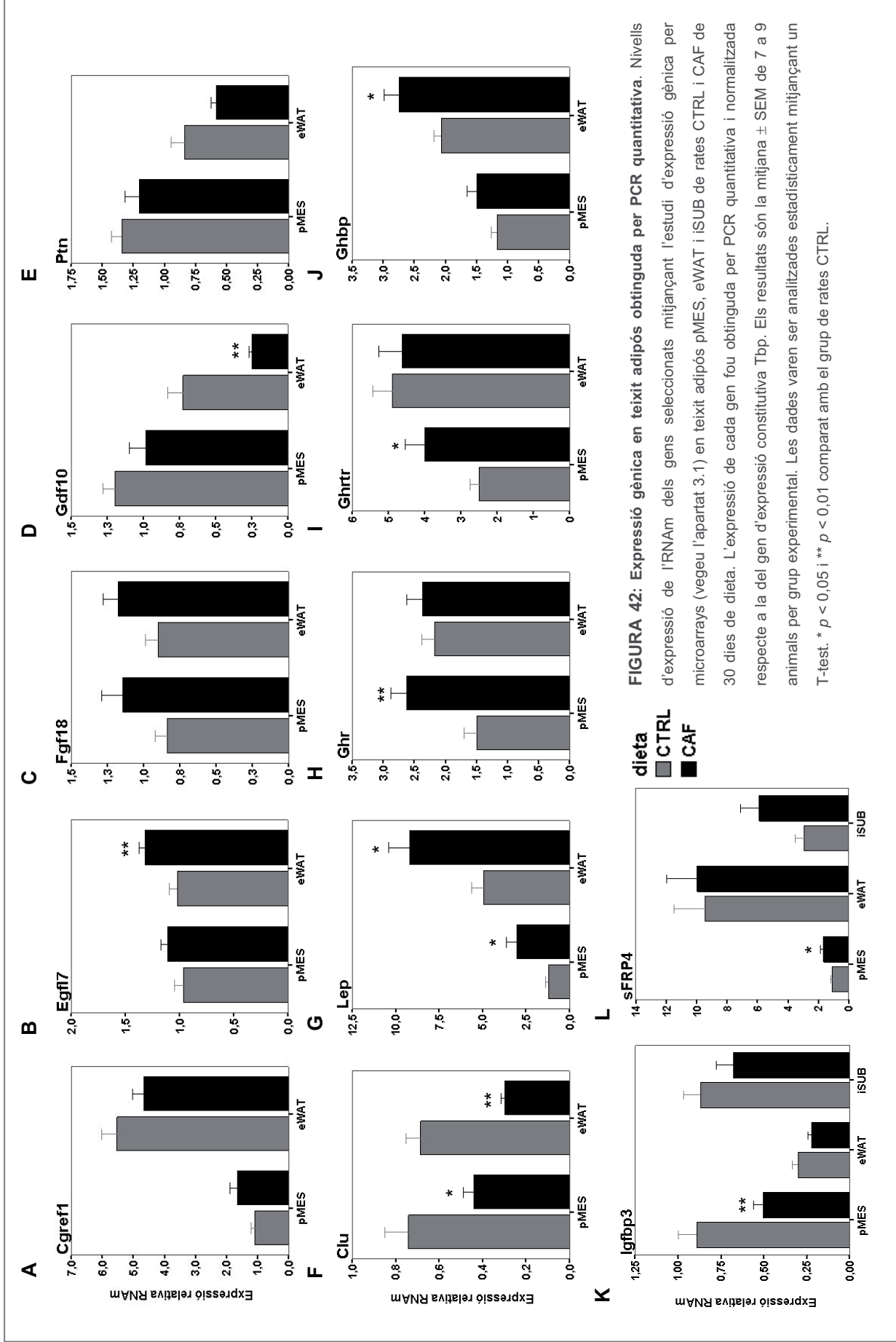
42F – 42G) tampoc els vàrem poder acceptar ja que mostraren canvis significatius entre rates control i de cafeteria no només en el teixit pMES, sinó també en l'eWAT.

Pel que fa al gen *Ghr*, aquest no codifica únicament per al receptor de l'hormona del creixement (*Ghr*) sinó per dues formes més d'aquest, que en rata i ratolí s'obtenen per *splicing* diferencial (Amit *et al.*, 1997; Baumbach *et al.*, 1989; Dastot *et al.*, 1998; Dastot *et al.*, 1996; Edens *et al.*, 1994). Una d'elles és un receptor de membrana truncat, el *Ghrtr*, que pot unir-se a la Gh però no transduir el senyal en mancar-li el domini citoplasmàtic. L'altre és la *Ghbp*, la qual es secretada conservant també l'habilitat per unir-se específicament a la Gh. En analitzar per PCR quantitativa l'expressió d'aquests tres transcrits, es confirmaren els resultats dels microarrays per als dos que donen lloc a proteïnes de membrana, *Ghr* (figura 42H) i *Ghrtr* (figura 42I). En canvi, en el cas del transcrit de la *Ghbp* (figura 42J), l'únic que ens interessava en codificar per a una proteïna secretable, no s'observaren diferències d'expressió entre les rates control i les de cafeteria en teixit pMES, motiu pel qual aquest gen també fou finalment descartat.

Així doncs, els únics gens que compliren les condicions establertes foren l'*Igfbp3* (figura 42K) i l'*Sfrp4* (figura 42L). D'una banda, la PCR quantitativa confirmà, tal com havíem observat en els microarrays, l'expressió diferencial d'aquests gens entre rates control i de cafeteria en teixit pMES, i d'altra banda, la seva expressió en els altres dos teixits adiposos analitzats, l'eWAT i l'iSUB, no mostrà canvis significatius induïts per la dieta de cafeteria.

Tant la proteïna *Sfrp4* com la *Igfbp3* són descrites preferentment com a inhibidores de la proliferació (Kawano i Kypta, 2003; Yamada i Lee, 2009). Ambdues actuen inhibint els lligands de dues importants vies, la de les Wnt i la dels Igf respectivament, les quals promouen la proliferació, la supervivència i la diferenciació cel·lular. La *Igfbp3*, a més, també pot dur a terme accions antiproliferatives i proapoptòtiques de manera independent dels IGF.

Com es mostra en la figura 42, l'expressió del gen *Sfrp4* en el teixit adipós pMES augmenta en les rates obeses; en canvi, la de l'*Igfbp3* disminueix. Només aquesta última disminució en l'expressió d'un gen antimitòtic podia explicar les majors propietats proliferatives que presentava el medi condicionat pMES de les rates obeses. Aquesta implicació d'un factor antiproliferatiu també era recolzada pels experiments de desactivació del medi condicionat (vegeu l'apartat 2.3), els quals ens havien suggerit que era un factor inhibidor, menys abundant en el medi pMES de les rates obeses, el responsable de la major proliferació induïda per aquest medi. Tenint en compte doncs, aquestes últimes observacions, vàrem considerar que la *Igfbp3* era la candidata més vàlida per explicar els efectes del medi condicionat i continuàrem el nostre estudi centrant-nos en la mateixa.



## 4. IMPLICACIÓ DE LA IGFBP3 EN L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA

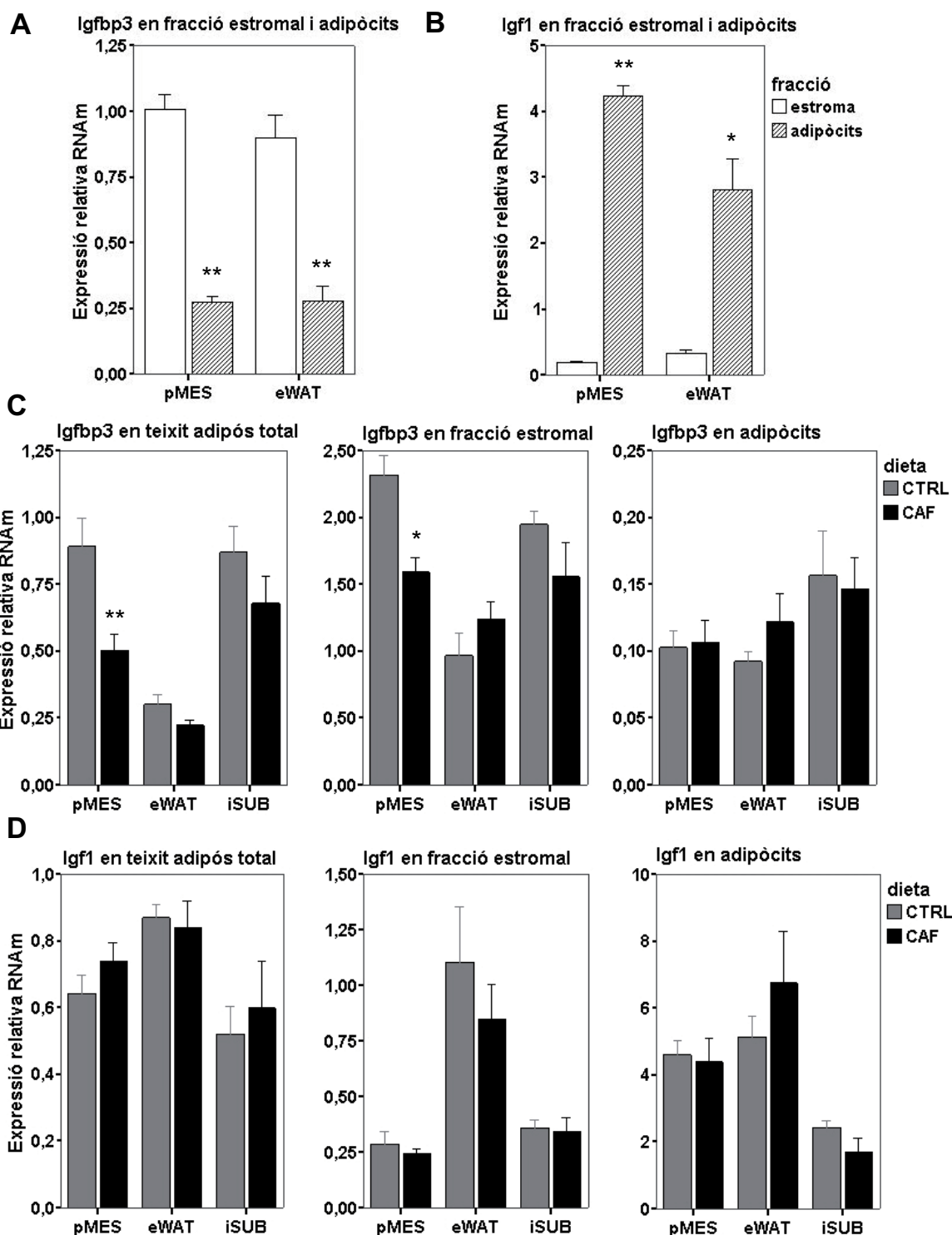
### 4.1. EXPRESSIÓ GÈNICA DE LA IGFBP3 I L'IGF1 EN LES FRACCIONS ESTROMAL I ADIPOCITÀRIA DEL TEIXIT ADIPÓS

L'elecció d'*Igfbp3* per estudiar més a fons la seva possible implicació en els efectes del medi condicionat pMES també fou motivada, en part, per la seva capacitat de modular l'activitat d'un factor molt relacionat amb l'expansió compensatòria de la massa de cèl·lula beta, l'*Igf1* (vegeu l'apartat 2.2.2 de la introducció). Atesa, doncs, la relació existent entre la *Igfbp3* i l'*Igf1*, vàrem considerar interessant mesurar l'expressió gènica d'aquest últim en teixit adipós. En aquest cas no detectàrem diferències significatives induïdes per la dieta en cap dels tres dipòsits analitzats (figura 43D). Aquests resultats, obtinguts per PCR quantitativa, corroboraren els dels microarrays, on tampoc no s'observà una expressió diferencial d'*Igf1* entre rates control i de cafeteria en teixit adipós pMES.

Els anteriors estudis d'expressió gènica els havíem realitzat en teixit adipós total. No obstant això, aquest teixit es troba integrat per diversos tipus cel·lulars, i per tant, l'expressió d'*Igfbp3* o d'*Igf1* podia ser específica d'un d'aquests. Per aquest motiu, vàrem separar els adipòcits de la resta de tipus cel·lulars del teixit adipós (estroma) i mesuràrem l'expressió d'*Igfbp3* i d'*Igf1* en ambdues fraccions, comprovant que la d'*Igfbp3* predominava en la fracció estromal i la d'*Igf1* en els adipòcits (figures 43A – 43B).

A continuació, vàrem mesurar els nivells de l'RNAm d'*Igfbp3* i d'*Igf1* en els tres dipòsits de teixit adipós (pMES, eWAT i iSUB) de rates de cafeteria i rates control, emprant cada fracció de teixit adipós per separat. Com es pot observar en la figura 43C, el patró d'expressió d'*Igfbp3* en la fracció on era més abundant, l'estromal, era molt comparable a l'obtingut amb la totalitat del teixit adipós. En ambdós casos només es detectava una expressió diferencial d'*Igfbp3* entre rates control i de cafeteria en el dipòsit pMES. En canvi, en la fracció adipocitària, l'expressió d'*Igfbp3* era molt inferior i no s'observaren diferències significatives entre les rates obesas i les control, en cap dels 3 dipòsits analitzats. Pel que fa a l'expressió d'*Igf1* (figura 43D), aquesta no mostrà canvis induïts per la dieta de cafeteria en cap dels dipòsits, tant en l'anàlisi de les seves fraccions per separat com de tot el teixit adipós sencer.

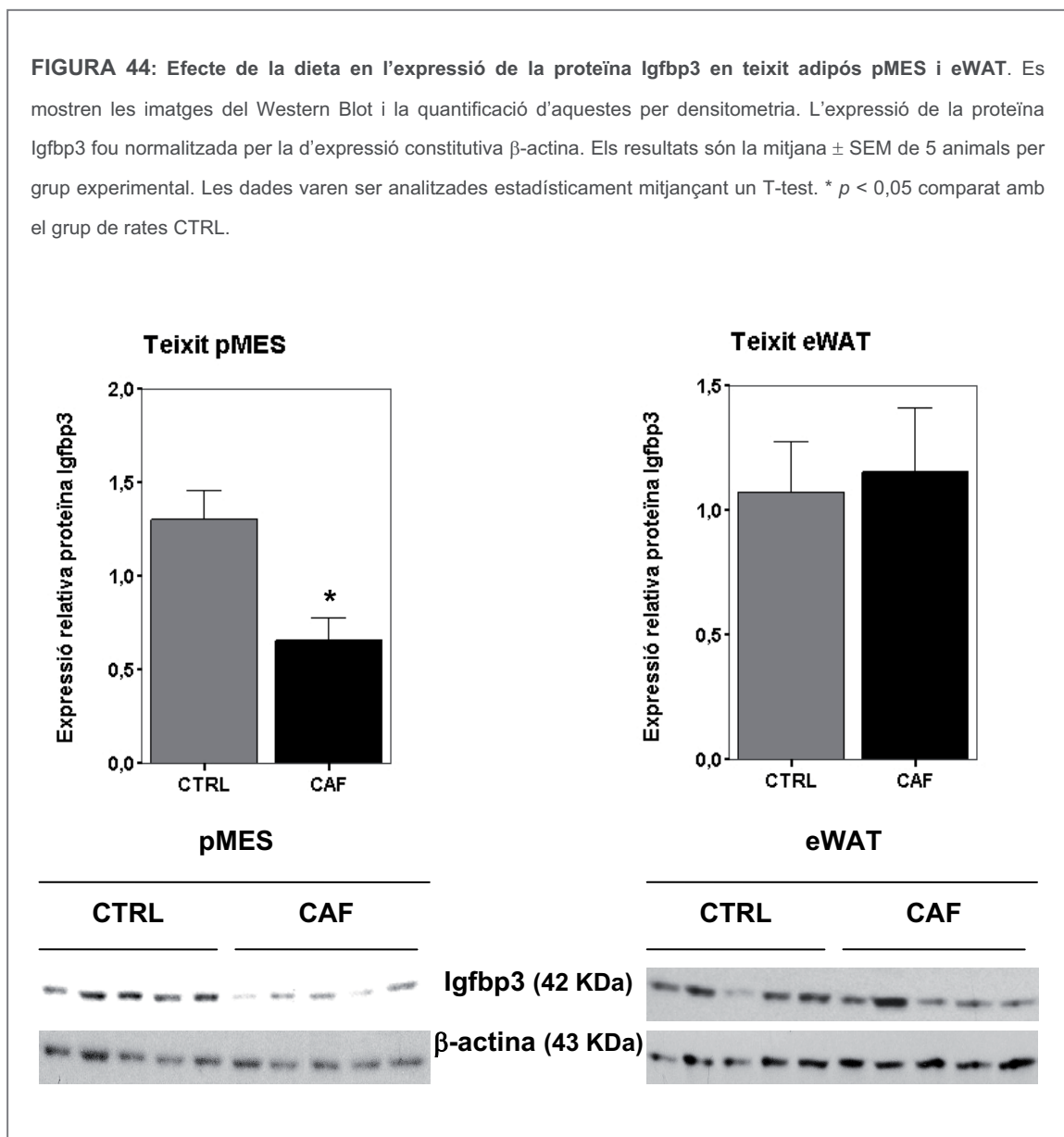
**FIGURA 43: Expressió gènica d'Igfbp3 i d'Igf1 en teixit adipós total o fraccionat.** Nivells d'expressió d'Igfbp3 i d'Igf1 en les fraccions estromal i adipocitària del teixits adiposos pMES i eWAT de rates control (A-B). Patró d'expressió d'Igfbp3 i d'Igf1 en teixit adipós total o en les seves fraccions estromal i adipocitària dels dipòsits pMES, eWAT i iSUB de rates CTRL i CAF de 30 dies de dieta (C-D). L'expressió gènica de cada gen fou obtinguda per PCR quantitativa i normalitzada respecte a la del gen d'expressió constitutiva Tbp. Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 7 a 9 animals per grup experimental. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test. \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$  comparat amb la fracció estromal (A i B) o comparat amb el grup de rates CTRL (C-D).



## 4.2. EXPRESSIÓ PROTEICA DE LA IGFBP3 EN TEIXIT ADIPÓS

Per continuar estudiant més a fons la possible implicació d'Igfbp3 en els efectes del medi condicionat pMES, vàrem comprovar si el patró d'expressió gènica d'*Igfbp3* en teixit adipós total (vegeu la figura 43C) es mantenia a nivell d'expressió proteica. En la figura 44 es pot observar que efectivament era així: l'expressió de la proteïna Igfbp3, com la del seu RNAm, es trobava reduïda en les rates de cafeteria respecte a la de les rates control només en teixit pMES, i en canvi, en teixit eWAT, no s'observaven diferències entre el dos grups dietètics.

**FIGURA 44:** Efecte de la dieta en l'expressió de la proteïna Igfbp3 en teixit adipós pMES i eWAT. Es mostren les imatges del Western Blot i la quantificació d'aquestes per densitometria. L'expressió de la proteïna Igfbp3 fou normalitzada per la d'expressió constitutiva  $\beta$ -actina. Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 5 animals per grup experimental. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test. \*  $p < 0,05$  comparat amb el grup de rates CTRL.

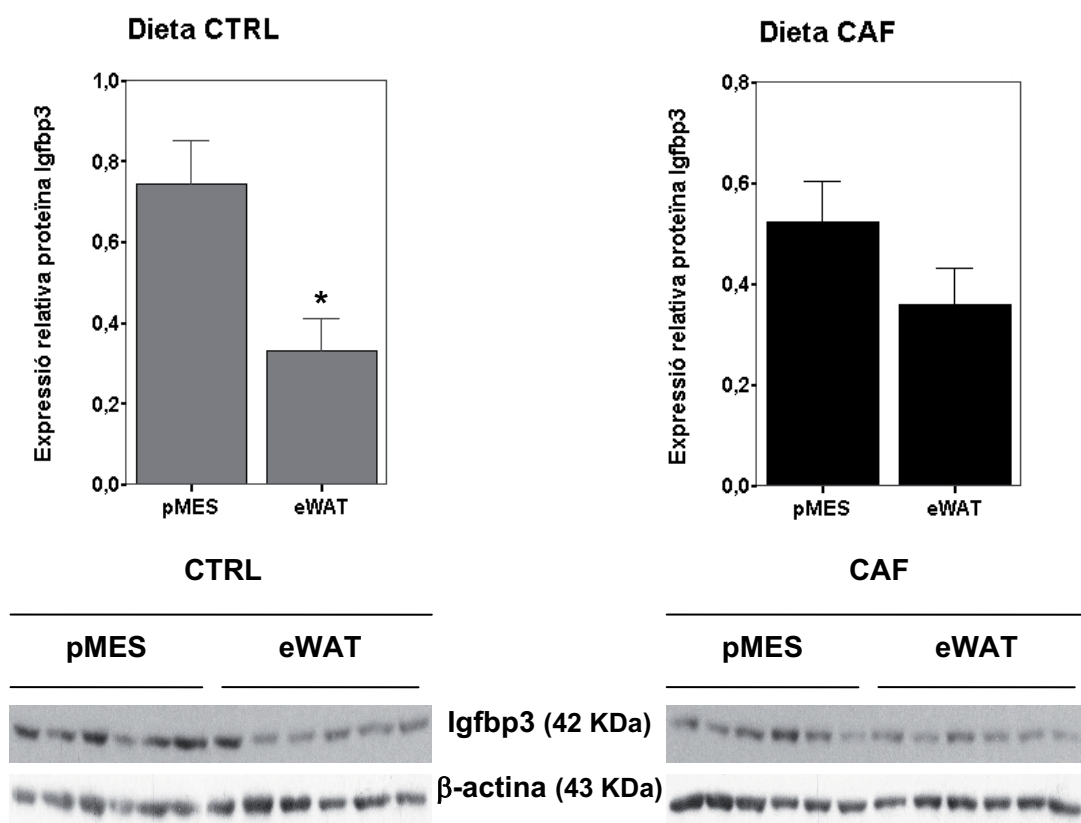




## Resultats

En l'anàlisi d'expressió gènica d'*Igfbp3* en teixit adipós total (vegeu la figura 43C), a més dels canvis induïts per la dieta en el teixit adipós pMES, també es pot observar que existeixen diferències molt marcades entre l'expressió d'*Igfbp3* en els dipòsits pMES i eWAT. Tot i que en la figura no s'especifica, aquestes diferències eren significatives tant dins del grup de les rates control ( $p < 0,01$  eWAT vs. pMES) com en el de les de cafeteria ( $p < 0,05$  eWAT vs. pMES). A nivell d'expressió proteica aquestes diferències entre els dos dipòsits es mantingueren (vegeu la figura 45). Tant en el grup control com en el de cafeteria, es podia observar que l'expressió proteica d'*Igfbp3* en el teixit eWAT era menor que en el pMES, tot i que aquest canvi només resultà significatiu en les rates control.

**FIGURA 45:** Diferent expressió de la proteïna *Igfbp3* en teixit adipós pMES i eWAT segons la dieta administrada. Es mostren les imatges obtingudes del Western Blot i la seva quantificació per densitometria. L'expressió de la proteïna *Igfbp3* fou normalitzada per la d'expressió constitutiva  $\beta$ -actina. Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 5 animals per grup experimental. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test. \*  $p < 0,05$  comparat amb el grup de rates CTRL.



### 4.3. SECRECIÓ DE LA IGFBP3 I L'IGF1

#### Quantificació de la Igfbp3 i l'Igf1 en medi condicionat pMES i eWAT

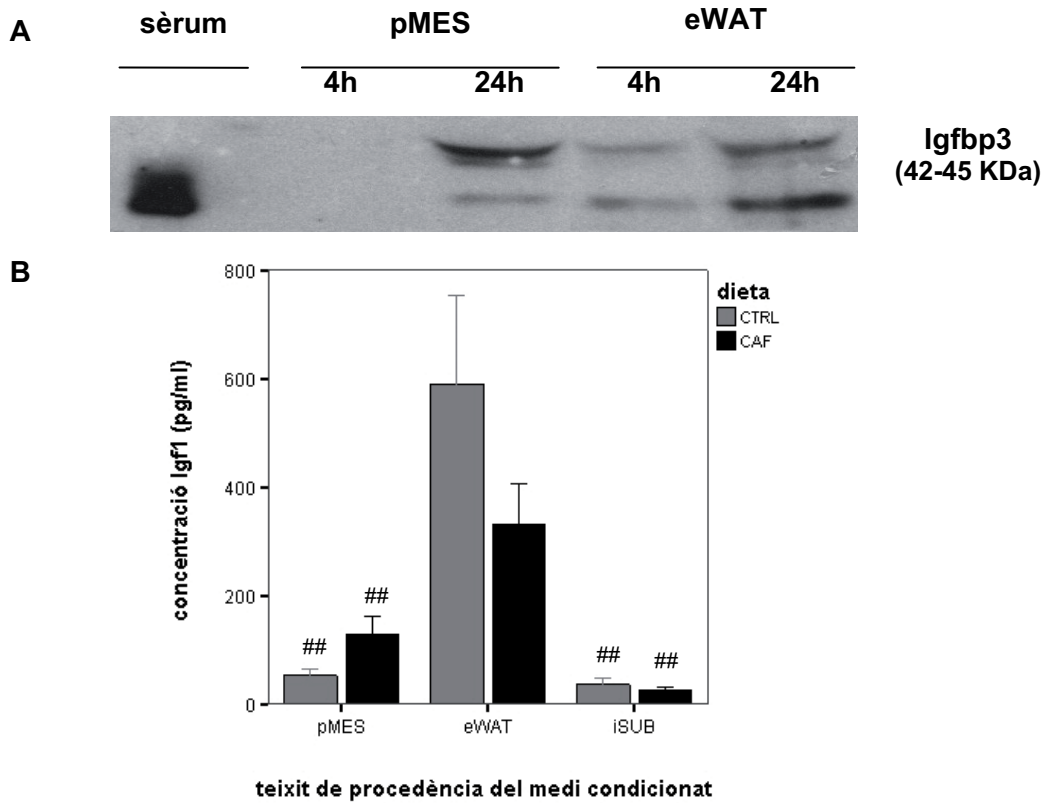
El següent pas que vàrem fer fou valorar els nivells de proteïna Igfbp3 una vegada secretada, és a dir, en el medi condicionat. Per dur a terme aquest estudi vàrem emprar la tècnica del Western Ligand, en la qual es detecten les proteïnes Igfbp sobre una membrana de nitrocel·lulosa, emprant els lligands naturals d'aquestes, els Igf (Fowlkes i Serra, 1996; Hossenlopp *et al.*, 1986).

En una primera aproximació, per tal de posar a punt la tècnica, vàrem intentar detectar la proteïna Igfbp3 en un medi condicionat de rata control. Cal dir que per aconseguir aquesta detecció va caldre concentrar prèviament les proteïnes del medi precipitant-les amb acetona (vegeu l'apartat 12.1 de materials i mètodes). Fent aquesta precipitació prèvia, i emprant medis condicionats incubats durant 4 hores amb teixit adipós pMES o eWAT (el mateix temps d'incubació emprat per realitzar els experiments de replicació), fou possible detectar la proteïna Igfbp3 secretada al medi pel teixit eWAT, però no pel pMES. Per tal d'incrementar encara més la concentració d'Igfbp3 en els medis condicionats, aquests foren incubats fins a 24 hores amb el teixit adipós; d'aquesta manera sí que s'aconseguí detectar la proteïna Igfbp3 en el medi condicionat pMES (vegeu la figura 46A).

A continuació vàrem utilitzar la tècnica del Western Ligand per intentar quantificar d'una manera més precisa la proteïna Igfbp3 en els medis condicionats i demostrar-ne la disminució en el medi condicionat pMES de rates obesas, tal com havíem fet amb l'expressió gènica i proteica. En aquest cas, però, no fou possible obtenir un resultat consistent a causa de la falta de precisió de la tècnica. El mètode emprat per a la concentració prèvia del medi mitjançant la precipitació de proteïnes no resultà suficientment acurat per fer comparables les mostres finals.

El que sí que vàrem poder quantificar en el medi condicionat va ser la concentració d'Igf1. En aquest cas, es mesurà la seva concentració per ELISA. Els resultats obtinguts es mostren en la figura 46B, i com s'hi pot observar, la dieta no modificà la concentració d'Igf1 en el medi condicionat de cap dels tres teixits analitzats. L'únic canvi significatiu fou l'increment de concentració en el medi condicionat de teixit eWAT de rates control respecte als medis de la resta de teixits.

**FIGURA 46: Valoració d'Igf1 i d'Igfbp3 en medi condicionat.** Detecció de la proteïna Igfbp3 per Western Ligand en medi condicionat pMES i eWAT de rates CTRL de 30 dies de dieta (A). Quantificació d'Igf1 per ELISA en medis condicionats de teixit pMES, eWAT i iSUB de rates CTRL de 30 dies (B). En B, els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 5 a 9 animals per grup experimental. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant una ANOVA per comparar els diferents grups. ##  $p < 0,01$  comparat amb el medi condicionat eWAT de rates control.



### Quantificació de la Igfbp3 i l'Igf1 en sèrum

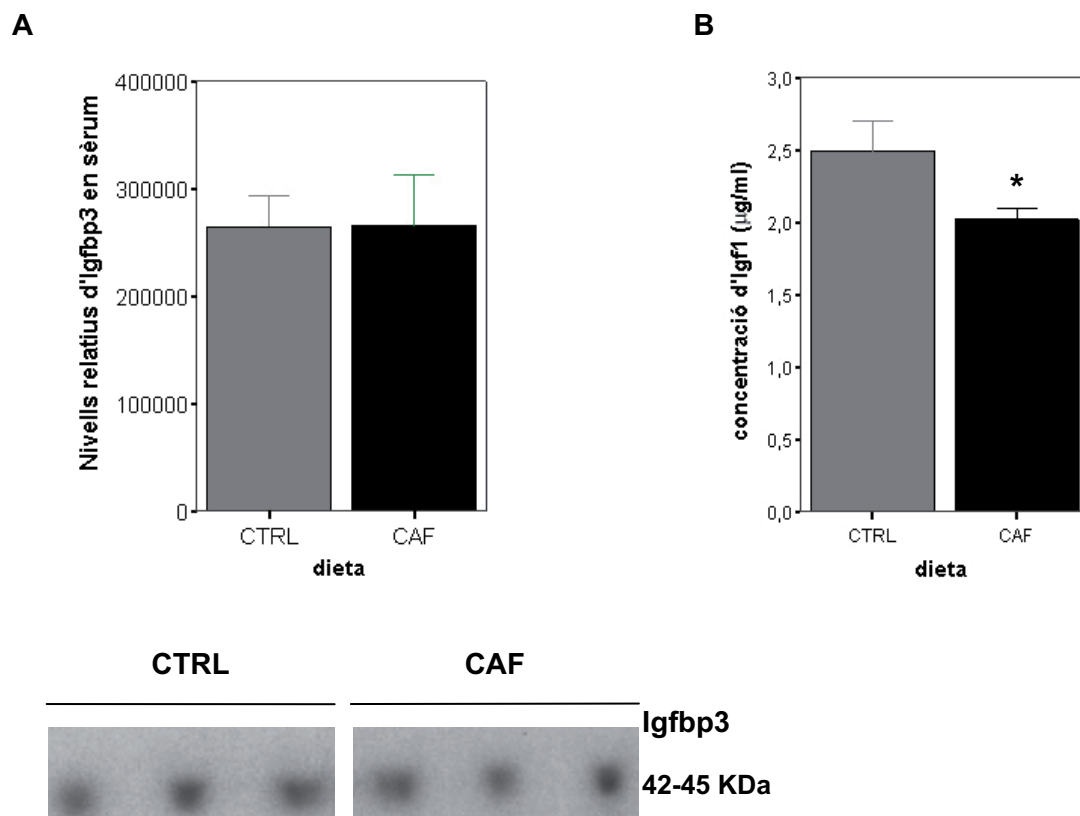
L'Igf1 i la Igfbp3 són secretats de manera endocrina principalment pel fetge. La Igfbp3 és present en elevades concentracions en la circulació, on transporta l'Igf1 i en regula els nivells lliures, i per tant, la bioactivitat. Tenint en compte aquest fet, ens vàrem plantejar si la inducció de l'obesitat en el nostre model podia modificar els nivells circulants d'Igf1 i d'Igfbp3.

Per detectar la Igfbp3 en sèrum empràrem el mateix mètode que en el cas del medi condicionat, el Western Ligand, el qual ja havia estat àmpliament emprat amb aquest fi. La concentració d'Igfbp3 en sèrum era prou elevada per poder detectar-la sense haver de concentrar prèviament la mostra, i per tant, en aquest cas, al contrari que en el del medi condicionat, la tècnica sí que fou prou precisa per comparar els diferents sèrums de rata.

En la figura 47A es mostra una figura representativa del Western Ligand i els resultats de la quantificació de la banda d'aquest corresponent a la Igfbp3, de 42-45 KDa, la qual no mostrà canvis significatius induïts per la dieta.

En el cas d'Igf1, la concentració del qual mesuràrem també per ELISA, sí que detectàrem canvis induïts per la dieta administrada a les rates. Tal com es pot observar en la figura 47B, les rates de cafeteria mostraven una disminució significativa de la concentració d'Igf1 en sèrum.

**FIGURA 47: Valoració d'Igf1 i d'Igfbp3 en sèrum.** (A) Quantificació d'Igfbp3 en sèrum de rates control o obesas de 30 dies de dieta. Es mostra una imatge representativa del Western Ligand i la quantificació per densitometria de la banda corresponent a la Igfbp3. Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM d'11 a 12 animals per grup experimental. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test sense detectar en cap cas diferències significatives. (B) Quantificació d'Igf1 per ELISA en sèrums de rates control o obesas de 30 dies de dieta. Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 20 animals per grup experimental. Atès que les dades no seguien una distribució normal, varen ser analitzades estadísticament mitjançant el test no paramètric U de Mann-Whitney, \*  $p < 0,05$  comparat amb el grup de rates CTRL.

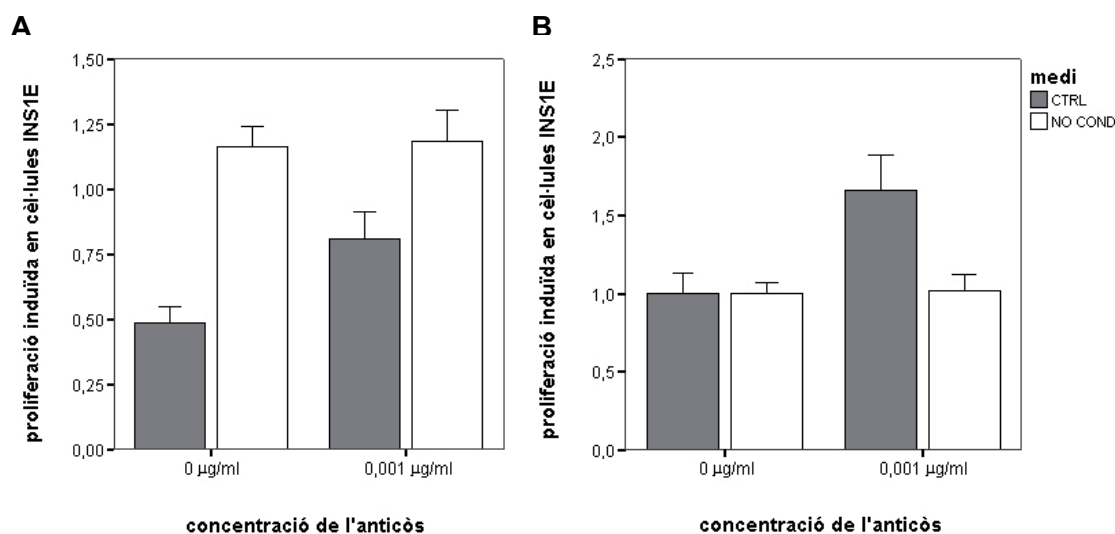


#### 4.4. EFECTE DE L'ADDICIÓ O EL BLOQUEIG D'IGFBP3 EN LA PROLIFERACIÓ INDUÏDA PEL MEDI CONDICIONAT PANCREÀTIC MESENTÈRIC

Amb els resultats descrits fins al moment, havíem aconseguit detectar la disminució de l'RNAm i de la proteïna Igfbp3 en resposta a l'obesitat en teixit adipós pMES. Pel que fa al medi condicionat, però, tot i que sí que hi havíem detectat la proteïna Igfbp3, no havíem pogut demostrar la seva disminució en rates de cafeteria. Per aquest motiu, emprarem una altra aproximació que ens permetés determinar si la Igfbp3 podia estar implicada en els efectes del medi condicionat pMES sobre la cèl·lula beta.

En primer lloc, vàrem utilitzar un anticòs contra la Igfbp3 per bloquejar-ne l'acció en el medi condicionat i estudiar-ne els efectes. En aquest experiment emprarem un medi condicionat procedent de teixit pMES de rata control, en el qual la concentració d'Igfbp3 havia de ser major que en el de cafeteria i, per tant, provocar una major inhibició de la proliferació. El nostre objectiu en afegir l'anticòs era revertir aquest efecte inhibidor d'Igfbp3 i, efectivament, tal com es mostra en la figura 48, aquest fou el resultat obtingut. En bloquejar la Igfbp3 present en el medi condicionat observarem que la proliferació induïda per aquest medi sobre les cèl·lules INS1E augmentava significativament.

**FIGURA 48: Efecte del bloqueig de la Igfbp3 en el medi condicionat pMES.** Proliferació induïda en cèl·lules INS1E pel medi condicionat de teixit pMES de rata CTRL o per un medi no condicionat, en presència o absència d'un anticòs contra Igfbp3. En tots els casos la proliferació induïda pels medis condicionats fou normalitzada respecte a la d'un medi no condicionat que es va incloure en cada experiment, i en B, a més, també fou normalitzada respecte a la proliferació mitjana induïda pels medis sense anticòs ([anticòs] = 0 µg/ml). Els resultats són la mitjana ± SEM de 4 a 5 experiments, cadascun realitzat amb medis condicionats procedents d'animals diferents. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test. \*  $p < 0,05$  comparat amb el mateix tipus de medi sense anticòs.

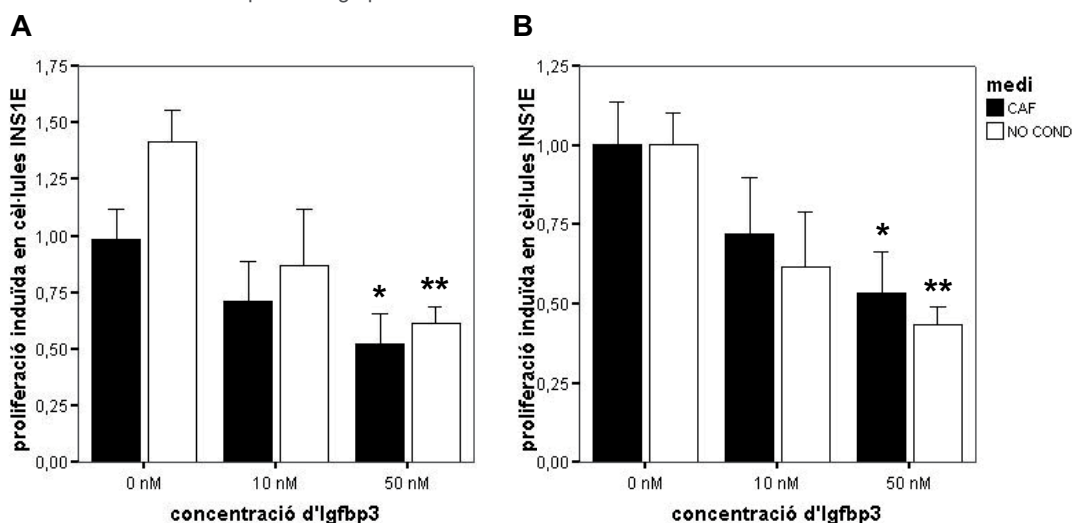


## Resultats

Per tal de descartar que l'anticòs tingués algun efecte per si sol en la proliferació de les cèl·lules INS1E, vàrem realitzar el mateix experiment emprant un medi no condicionat, és a dir, un medi que no havia estat en contacte amb teixit adipós i, per tant, no contenia la proteïna Igfbp3. En aquest cas, l'addició de l'anticòs no va tenir cap efecte en la proliferació induïda pel medi no condicionat en les cèl·lules INS1E (vegeu la figura 48).

En segon lloc, estudiàrem els efectes directes d'Igfbp3 sobre les cèl·lules INS1E afegint la proteïna Igfbp3 recombinant als medis de cultiu. En aquest cas, vàrem emprar també un medi no condicionat, però canviàrem el medi condicionat pMES de rata control per un de rata de cafeteria. En el medi condicionat de rata obesa la concentració d'Igfbp3, i per tant el seu efecte antiproliferatiu, havien de ser baixos, fet que justificaria la major proliferació induïda per aquest medi en les cèl·lules INS1E. El nostre propòsit en incrementar la concentració d'Igfbp3 en aquest medi afegint-hi la proteïna recombinant era inhibir la proliferació. Com es mostra en la figura 49, l'addició d'Igfbp3 al medi condicionat de rata obesa causà una disminució en la proliferació de les cèl·lules INS1E, tal com esperàvem. En afegir la Igfbp3 al medi no condicionat també vàrem obtenir una inhibició de la proliferació cel·lular.

**FIGURA 49: Efecte de l'addició de la Igfbp3 en el medi condicionat pMES.** Proliferació induïda en cèl·lules INS1E pel medi condicionat de teixit pMES de rata CAF o per un medi no condicionat, en presència o absència de la proteïna Igfbp3 recombinant. En tots els casos la proliferació induïda pels medis condicionats fou normalitzada respecte a la d'un medi no condicionat que es va incloure en cada experiment, i en B, a més, també fou normalitzada respecte a la proliferació mitjana induïda pels medis sense la proteïna Igfbp3 recombinant ([proteïna recombinant] = 0nM). Els resultats són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 experiments, cadascun realitzat amb medis condicionats procedents d'animals diferents. Les dades varen ser analitzades estadísticament mitjançant un T-test. \*  $p < 0,05$  o \*\*  $p < 0,001$  comparat amb el mateix medi sense la proteïna Igfbp3 recombinant.



## V. DISCUSSIÓ





## 1. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL D'OBESITAT

En la caracterització del nostre model d'obesitat comprovarem que, com en els estudis realitzats anteriorment amb aquest mateix model (Claret *et al.*, 2004; Claret *et al.*, 2005), la dieta de cafeteria permetia aconseguir un guany de pes important en un període de temps curt. L'evolució del pes corporal dels animals alimentats amb la dieta de cafeteria també era molt semblant a la que es descriu en altres publicacions on s'empren dietes similars (Coatmellec-Taglioni *et al.*, 2000; Llado *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2003; Margareto *et al.*, 2001; Redonnet *et al.*, 2001). La rapidesa en l'adquisició del fenotip obès es deu a l'elevat contingut calòric de la dieta de cafeteria, però també a la hiperfàgia que provoca en els animals, gràcies a la seva elevada palatabilitat, és a dir, a la varietat i el bon sabor dels seus ingredients (Claret *et al.*, 2004; Claret *et al.*, 2005).

Com a conseqüència de l'excessiva ingesta calòrica, les rates de cafeteria mostraven un important augment de l'adipositat i de la mida dels adipòcits. També presentaven un increment dels nivells plasmàtics de NEFA, el qual és característic del fenotip obès i es deu a l'excessiva acumulació de lípids en el teixit adipós (Arner, 2002). Segons s'ha descrit, aquesta alteració té lloc perquè els adipòcits hipertrofiats són més resistents a la insulina i, per tant, alliberen més NEFA en disminuir en aquests la repressió de la lipòlisi per part de la insulina (Frayn, 2002).

L'increment dels nivells circulants de NEFA es considera un dels desencadenants principals de l'estat de resistència a insulina associat a l'obesitat. En condicions normals, els NEFA són alliberats en estat postabsortiu pel teixit adipós i constitueixen la principal font d'energia dels teixits perifèrics, on també hi duen a terme un seguit d'accions que tenen com a objectiu assegurar una glucèmia suficient per proveir els teixits que són totalment dependents de glucosa, és a dir, el cervell i els glòbuls vermells. No obstant això, aquestes accions resulten inadequades quan els NEFA són alliberats en excés i les seves concentracions circulants són massa elevades. En aquestes condicions, es redueix la captació de glucosa per tots els teixits perifèrics, incrementa la producció de glucosa i triglicèrids pel fetge i també queda afectada la secreció d'insulina per la cèl·lula beta, en especial quan l'exposició als NEFA és massa prolongada (Eldor i Raz, 2006; Roden *et al.*, 1996; Roden *et al.*, 2000). En conjunt, aquests efectes contribueixen a empitjorar encara més l'estat de resistència a insulina i condueixen a l'aparició d'intolerància a glucosa i d'hiperglucèmia, unes alteracions que també vàrem observar, en major o menor grau, en el nostre model d'obesitat. Les rates de cafeteria no mostraven hiperglucèmia en estat basal, però sí en el test de tolerància a glucosa, de manera que no arribaven a desenvolupar diabetis però sí intolerància a glucosa. La resistència a insulina en

aquestes rates també era evidenciada per la hiperinsulinèmia que presentaven, tant en estat basal com en el test de tolerància a glucosa.

En l'estudi morfològic que realitzàrem del pàncrees vàrem poder observar que la hiperinsulinèmia de les rates de cafeteria era mitjançada, almenys en part, per una expansió de la massa de cèl·lula beta, la qual valoràrem indirectament a partir del percentatge d'àrea d'insulina en el pàncrees. També comprovàrem que comprenia un augment de la mida i el nombre d'illots, i era mitjançada principalment per la replicació i la hipertròfia de les cèl·lules beta. La replicació en les rates de cafeteria es mantenia sempre superior a la de les controls, però també cal dir que s'anava reduint progressivament al llarg del temps tant en el grup control com en el de cafeteria. La mida de la cèl·lula beta, en canvi, augmentava juntament amb la durada de la dieta de cafeteria, i a partir dels 30 dies era superior en les rates de cafeteria que en les control. La contribució de la neogènesi a l'increment de la massa de cèl·lula beta de les rates obeses no semblava gaire significativa, ja que el nombre d'agregats de menys de 4-5 cèl·lules beta (illots de nova formació) no era modificat pel tipus de dieta o per la seva duració. Cal tenir en compte que aquest últim paràmetre (el nombre d'agregats de menys de 4-5 cèl·lules beta) és menys específic que d'altres mètodes emprats per valorar la neogènesi, com per exemple el nombre de cèl·lules positives per insulina situades en els ductes pancreàtics. No obstant això, presenta l'avantatge de ser més fàcilment valorable i, a més, ha estat descrit prèviament per diferents estudis (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2001; Jetton *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2006), motiu pel qual el vàrem considerar vàlid per obtenir una mesura, encara que fos aproximada, del grau de neogènesi.

La implicació destacada de la replicació que observem en el nostre model d'obesitat és un fet descrit per molts altres estudis similars, en els quals també s'indueix obesitat mitjançant dieta (Matveyenko *et al.*, 2009; Sone i Kagawa, 2005; Terauchi *et al.*, 2007; Tschen *et al.*, 2009). De fet, la replicació sembla ser el mecanisme més comú pel qual incrementa la massa de cèl·lula beta després del naixement en diverses circumstàncies. Les evidències més rellevants en aquest sentit provenen dels estudis de llinatge genètic de Dor *et al.*, 2004 i Teta *et al.*, 2007, en els quals es comprovà que l'augment de massa de cèl·lula beta, en resposta al creixement normal o després d'una pancreatectomia, té lloc principalment per replicació i no per neogènesi. Un altre resultat en comú amb altres estudis previs és la reducció de la replicació que observem a mesura que avança l'edat. Segons s'ha descrit, aquesta reducció progressiva de la replicació pot arribar a afectar la resposta compensatòria que es dona normalment davant de l'obesitat, de manera que quan l'obesitat es desenvolupa en edats massa avançades, no s'associa a un augment de la replicació ni de la massa de cèl·lula beta (Sone i Kagawa, 2005; Tschen *et al.*, 2009). Aquest però, no seria el cas del nostre model, on l'obesitat s'indueix

a una edat jove (2-2,5 mesos) i la replicació de la cèl·lula beta sempre és manté superior en les rates de cafeteria, fet que possibilita l'increment de la massa de cèl·lula beta en aquestes.

La hipertròfia és un altre dels mecanismes que trobem implicat en l'augment de la massa de cèl·lula beta de les rates de cafeteria. En certs treballs previs també es detecta una hipertròfia de la cèl·lula beta quan augmenta el pes corporal. Un d'aquests és el de Montanya *et al.*, 2000, en el qual s'estudia l'evolució de la massa de cèl·lula beta durant el creixement fisiològic normal de rates entre 1 i 20 mesos d'edat. Els resultats que s'hi obtenen mostren que durant els primers mesos de vida l'augment de la massa de cèl·lula beta és dona principalment per replicació. A mesura que avança l'edat però, sobretot a partir dels 3 o 4 mesos, la replicació es va reduint, i és la hipertròfia la que contribueix més significativament a l'augment de la massa de la cèl·lula beta en les edats més avançades (aproximadament a partir dels 7 mesos). En aquest sentit, els nostres resultats també donarien suport a una actuació de la hipertròfia a llarg termini, ja que en la franja d'edat que analitzem, la qual podem considerar jove (dels 2 als 3,5 mesos), les rates control no mostren canvis en la mida de la cèl·lula beta. Només es detecta una hipertròfia de la cèl·lula beta en les rates obeses i a partir dels 30 dies de dieta, quan ja s'ha induït, mitjançant la dieta de cafeteria, un increment de pes addicional al causat únicament pel creixement normal.

El fet que la neogènesi no sembli participar en l'increment de massa de cèl·lula beta del nostre model d'obesitat tampoc no és estrany, ja que, com ja s'ha indicat abans, s'ha demostrat que és la replicació i no la neogènesi la que participa més en aquest procés. Segons alguns autors, la neogènesi només entraria en joc en certes circumstàncies particulars. Per exemple, una situació en la qual s'han aconseguit evidències clares de la seva contribució a la resposta compensatòria de la cèl·lula beta, és la de regeneració del pàncrees després d'una lligació parcial del ducte (Xu *et al.*, 2008). En el cas de l'obesitat també existeixen treballs en què es descriu una contribució més important de la neogènesi que de la replicació a l'increment de la massa de cèl·lula beta (Jetton *et al.*, 2005). En aquest últim però, el model estudiat és curiosament el de la rata Zucker fa/fa, on l'obesitat no és induïda per dieta sinó causada per la deficiència en leptina. En el nostre estudi, un resultat que podria suggerir l'existència de neogènesi és l'increment del nombre d'illots per àrea de pàncrees observat després de 60 dies de dieta de cafeteria; uns illots que es podrien haver format de nou per neogènesi, tot i que nosaltres no vàrem poder detectar-la. Una possible explicació d'aquest fet, és que l'interval de temps en el qual es van originar aquest illots no va coincidir amb els temps de dieta concrets que analitzàrem, i per tant no els vàrem poder detectar quan la seva mida era inferior a les 500  $\mu\text{m}^2$ , però sí quan ja l'havien superat. Una altra possibilitat és que

aquests illots no es formessin per neogènesi sinó per la divisió d'altres illots preexistents, ja que segons s'ha descrit prèviament, aquest és també un possible mecanisme de nova formació d'illots (Seymour *et al.*, 2004).

A mode de conclusió podem afirmar que en el model de rata de cafeteria hi té lloc un augment de massa de cèl·lula beta en resposta a l'obesitat, el qual s'explica perquè les rates obesas mostren una major replicació de la cèl·lula beta de manera sostinguda des dels 10 fins als 60 dies de dieta i també una hipertròfia de la mateixa a partir dels 30 dies de dieta. Aquests resultats, que concorden amb els de la majoria d'estudis previs, ens confirmen que el model d'obesitat escollit és adequat per comprovar la nostra hipòtesi de treball i estudiar la implicació dels factors derivats del teixit adipós en la resposta compensatòria de la cèl·lula beta.

## 2. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA

Una vegada constatada l'expansió de la massa de cèl·lula beta en el model de rata de cafeteria, procedirem a validar la nostra hipòtesi de treball, estudiant la possible estimulació de la replicació de la cèl·lula beta per part de factors derivats del teixit adipós. Analitzarem la replicació de la cèl·lula beta, ja que, segons havíem comprovat, aquest era el mecanisme més important pel qual es donava l'expansió de massa de cèl·lula beta en el nostre model d'obesitat. Per fer-ho, vàrem incubar diferents teixits adiposos, extrets de rates obeses i controls, en medi de cultiu. Els medis condicionats obtinguts així foren emprats per cultivar la línia cel·lular beta INS1E i mesurar la replicació que hi induïen. Els resultats obtinguts mostraren que de tots els medis condicionats analitzats, el procedent de teixit adipós pMES era l'únic que induïa una major proliferació en les cèl·lules beta en resposta a l'obesitat.

El model de cèl·lula beta que vàrem escollir per dur a terme aquests assaigs de proliferació, les cèl·lules INS1E, és un subclon de la línia cel·lular d'insulinoma de rata INS1. En tractar-se d'un subclon, les INS1E són més estables i homogènies que altres línies cel·lulars com per exemple les mateixes INS1 de les quals procedeixen (Merglen *et al.*, 2004). Presenten un fenotip de cèl·lula beta ben diferenciat, que mantenen després d'un nombre elevat de passatges. També poden considerar-se vàlides per dur a terme assaigs de proliferació, tenint en compte que diferents autors les han emprades prèviament amb aquest fi (Altirriba *et al.*, 2009; Friedrichsen *et al.*, 2006; Iguchi *et al.*, 2007; You i Laychock, 2009). Tanmateix, una diferència òbvia d'aquest model respecte de les cèl·lules beta primàries és que presenta un grau de replicació molt superior. Aquest índex mitòtic elevat resulta avantatjós, ja que permet mesurar més sensiblement la incorporació de timidina tritiada en els assaigs de proliferació. No obstant això, també implica un cert grau de creixement aberrant que fa que els resultats obtinguts amb una línia cel·lular com les INS1E no sempre siguin un reflex exacte del que succeeix en les cèl·lules beta primàries. Per aquest motiu, també vàrem estudiar els efectes del medi condicionat pMES en illots pancreàtics de rata, on vàrem poder corroborar els resultats obtinguts amb les cèl·lules INS1E, en ser la proliferació induïda en illots pel medi condicionat pMES de rates obeses també major que la del medi procedent de les rates control.

El medi condicionat de teixit adipós és una aproximació emprada sovint per mimetitzar les accions del teixit adipós sobre determinades cèl·lules diana. Les propietats proliferatives del mateix han estat descrites en nombrosos estudis i, tal com indiquen els nostres resultats, l'obesitat tendeix a incrementar-les. Aquesta major capacitat mitogènica, en resposta a l'obesitat, sembla ser el resultat de canvis en el perfil de secreció que els adipòcits experimenten en hipertrofiar-se (Marques *et al.*, 1998). Les cèl·lules diana d'aquests factors mitogènics són principalment els preadipòcits del mateix teixit adipós (Cooper i Roncari, 1989; Lau *et al.*, 1987; Marques *et al.*, 1998), però també s'ha demostrat que poden actuar sobre altres tipus cel·lulars. Per exemple, s'ha pogut comprovar que les cèl·lules del múscul lli vascular repliquen més quan se les cultiva amb medi condicionat de teixit adipós perivascular, fet que s'ha relacionat amb l'engruiximent de les parets dels vasos sanguinis i les complicacions cardiovasculars que s'associen a l'obesitat (Barandier *et al.*, 2005; Takaoka *et al.*, 2009). Un cas similar és el de les cèl·lules de l'epiteli mamari, les quals s'ha demostrat que responen a factors alliberats pel teixit adipós que les envolta, tant durant el desenvolupament mamari normal com en processos tumorals (Beck i Hosick, 1988; Beck *et al.*, 1989; Hovey *et al.*, 1998; Levine i Stockdale, 1984; Shappell *et al.*, 1991; Walden *et al.*, 1998). Les cèl·lules beta no són una excepció i també han estat descrites com a cèl·lules diana de factors secretats pel teixit adipós. En una publicació recent s'ha demostrat que un medi condicionat, en aquest cas d'adipòcits aïllats de teixit adipós mamari humà, és capaç d'induir la proliferació de cèl·lules INS1 i d'illots pancreàtics de ratolí (Schinner *et al.*, 2008). Els autors d'aquest estudi també mostren que aquests efectes són mitjançats per lligands de la via WNT, una via a la qual pertany una de les possibles proteïnes implicades en els efectes del medi condicionat pMES que obtenim en el nostre estudi, l'Sfrp4. Deixant de banda aquesta coincidència, la troballa més important en comú entre el treball de Schinner *et al.* i el nostre és que ambdós evidencien l'acció de productes alliberats pel teixit adipós sobre la replicació de les cèl·lules beta. Tanmateix, també cal dir que els nostres resultats aporten dades addicionals a aquest camp en indicar que aquests factors mitòtics són induïts per l'obesitat i de manera específica en un únic dipòsit de teixit adipós, el pMES.

Aquests efectes associats a l'obesitat, i el fet que siguin específics d'un dipòsit en concret, són fins a cert punt resultats esperables. És un fet àmpliament conegut que cada dipòsit de teixit adipós té un perfil de secreció diferent i que, a més, aquest canvia en resposta a l'obesitat. Per exemple, el teixit adipós visceral secreta majors quantitats d'adiponectina i menys de leptina que el teixit adipós subcutani (Arner, 2001). L'obesitat també afecta la secreció d'aquestes adipocitocines, augmentant la de leptina i reduint la d'adiponectina. Les diferències entre dipòsits no només es restringeixen al seu perfil de

secreció, sinó que també són evidenciades per certes característiques metabòliques distintives. Per exemple, el dipòsit visceral és més resistent que el subcutani a la inhibició de la lipòlisi o a la captació de glucosa estimulades per la insulina, cosa que contribueix a augmentar els nivells circulants de NEFA i de glucosa (Lafontan i Berlan, 2003). Altres trets diferencials es troben en la modalitat de creixement preferent (hiperplàsia *versus* hipertròfia) o en el grau d'inervació o irrigació (Hausman *et al.*, 2001). Aquests exemples són només una petita mostra de l'elevada heterogeneïtat existent entre els diferents dipòsits de teixit adipós, la qual ens suggereix que tot i formar part d'un mateix "òrgan adipós", cadascun d'ells està especialitzat per dur a terme certes funcions concretes. A favor d'aquesta idea, doncs, els nostres resultats indicarien que una de les funcions concretes del teixit adipós peripancreàtic podria ser la de modular la proliferació de les cèl·lules beta. Aquesta funció també tindria sentit tenint en compte que és precisament el dipòsit visceral, al qual pertany el teixit adipós pMES, el més implicat en el desenvolupament de la resistència a insulina i la diabetis de tipus 2 associades a l'obesitat (Despres i Lemieux, 2006).

La regulació de la proliferació en la cèl·lula beta es troba estretament lligada al metabolisme de la glucosa. La glucosa per si sola és un dels estímuls més potents per a la proliferació de les cèl·lules beta i actua preferentment a concentracions entre 6 i 24 mM. La glucosa, a més, té la capacitat de potenciar l'efecte d'altres factors de creixement, com l'IGF1 o la GH, que també mostren una major inducció de la replicació de la cèl·lula beta a concentracions de glucosa dins del rang fisiològic rellevant (6-18 mM) (Cousin *et al.*, 1999; Hugl *et al.*, 1998). Els assaigs de proliferació inicials del nostre estudi els realitzàrem a una concentració basal de glucosa de 5,5 mM, per tal de distingir millor els possibles efectes del medi condicionat sobre la replicació de les cèl·lules INS1E. No obstant això, posteriorment també vàrem voler comprovar si aquests efectes, en concret els del medi condicionat pMES, eren potenciats per la glucosa emprant-ne una concentració més elevada, de 15 mM. Tal com havíem observat en els assaigs inicials, el medi obtingut del teixit pMES de rates obesas causava una major proliferació en les cèl·lules INS1E que el medi de rates control, però aquest augment era molt similar, aproximadament del doble, tant a baixa com a alta concentració de glucosa. L'increment de la proliferació provocat per la glucosa sobre el de cada medi per separat també fou quasi el mateix, d'1,7. Per tant, aquests resultats ens indicaren que la glucosa no potenciava els efectes del medi condicionat.

Per caracteritzar la naturalesa dels agents presents al medi condicionat pMES també vàrem comprovar si els seus efectes sobre la proliferació de la cèl·lula beta es



mantenien després d'una desactivació per calor. Els resultats ens indicaren que el tractament per calor abolia els efectes del medi condicionat i, per tant, els factors que n'eren responsables eren de naturalesa termolàbil i possiblement proteica. Però el més interessant d'aquest assaig de proliferació fou que vàrem poder comprovar que la desactivació no afectava la proliferació induïda pel medi pMES de rates obesas, sinó que incrementava la del medi de les rates control, fins a igualar les proliferacions provocades per ambdós medis. Segons aquests resultats, el factor o factors responsables dels efectes observats havien d'actuar com a inhibidors de la proliferació i la seva reducció en el medi de cafeteria seria la que causaria la major proliferació induïda per aquest medi.

En conclusió, els resultats de l'estudi de proliferació de la cèl·lula beta en resposta als medis condicionats de teixit adipós ens indicaren que:

1. El teixit adipós allibera factors capaços d'induir la proliferació de la cèl·lula beta, fet que confirmà la nostra hipòtesi de treball.
2. Els efectes del medi condicionat són específics del teixit adipós que envolta el pàncrees, el pMES, i a més són induïts per l'obesitat.
3. Els efectes del medi condicionat no són potenciats per la glucosa.
4. Els factors responsables d'aquest efectes són de naturalesa termolàbil i actuen preferentment com a inhibidors de la proliferació.

### 3. CERCA DE GENS CANDIDATS RESPONSABLES DE L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA

La detecció dels efectes específics del medi condicionat pMES sobre la proliferació de la cèl·lula beta en resposta a l'obesitat ens va portar a cercar els possibles factors implicats en aquests efectes. L'estratègia emprada va consistir, en primer lloc, en l'anàlisi de l'expressió gènica del teixit adipós pMES en rates control i de cafeteria. A continuació, del total de gens diferencialment expressats entre aquests dos grups, foren seleccionats els que codificaven per a proteïnes secretables, ja que el factor responsable dels efectes mitòtics observats havia de ser secretat al medi condicionat per poder dur a terme les seves accions. Per últim, mitjançant una cerca bibliogràfica vàrem escollir els gens pels quals s'havien descrit prèviament accions sobre la proliferació cel·lular i, per tant, podien mitjançar d'alguna manera els efectes proliferatius del medi condicionat. A continuació descrivim els 10 gens obtinguts d'aquesta selecció:

#### Leptina (*Lep*)

Com es descriu en la introducció d'aquesta tesi, la leptina és una adipocitocina secretada pel teixit adipós que presenta una elevada pleiotropia funcional. La seva funció més ben caracteritzada és la de regular l'homeòstasi energètica i el metabolisme, tant a nivell central com perifèric, però també ha demostrat que té un important paper en molts altres processos biològics. L'increment dels nivells de leptina en l'obesitat ha motivat la investigació de la seva implicació en el desenvolupament de certs tipus de càncer que presenten una major incidència en l'obesitat, com són el càncer de mama, de pròstata o de còlon (Garofalo i Surmacz, 2006). En molts d'aquests estudis s'ha demostrat la capacitat de la leptina per promoure la proliferació en diferents línies tumorals. Segons aquestes dades, doncs, podem considerar l'efecte de la leptina sobre la proliferació cel·lular com a positiu.

#### Fibroblast growth factor 18 (*Fgf18*)

L'*Fgf18* pertany a la família dels *fibroblast growth factors*, els membres de la qual mostren un ampli ventall d'accions mitogèniques i antiapoptòtiques. Aquests participen en nombrosos processos biològics com el creixement i la diferenciació cel·lular, la morfogènesi, la reparació tissular o el creixement tumoral. L'*Fgf18*, concretament, desenvolupa un important paper en el desenvolupament i el creixement ossi, però també és expressat per molts altres teixits, on duu a terme funcions diverses (Haque *et al.*,

2007). Els efectes biològics de l'Fgf18 han estat investigats mitjançant la seva administració exògena o sobreexpressió en ratolí (Hu *et al.*, 1998). En ambdós casos s'observà que l'Fgf18 estimulava la proliferació de cèl·lules mesenquimals i epitelials, sobretot en el fetge i els intestins, però també en altres teixits com els ronyons, el cor, els testicles, la melsa i els músculs esquelètics. Per tant, podem concloure que l'efecte de l'Fgf18 sobre la proliferació cel·lular és positiu.

### Secreted frizzled related protein 4 (*Sfrp4*)

La proteïna Sfrp4 pertany a una família d'antagonistes de la via de senyalització de les Wnt (*Wingless type*). Les Wnt són factors de creixement que promouen el desenvolupament i el creixement cel·lular. Ha estat descrita la seva participació en diverses cascades de senyalització, tot i que la més ben caracteritzada és l'anomenada "via canònica" o de la  $\beta$ -catenina. L'activació d'aquesta via permet l'estabilització de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma i la seva consegüent translocació al nucli, on activa la transcripció dels seus gens diana a través dels factors de transcripció TCF/LEF (*T cell-specific transcription factor and lymphoid enhancer-binding factor families*) (Logan i Nusse, 2004).

Les Sfrp, antagonitzen les accions de les Wnt unint-se a elles o als seus receptors, impedit l'associació d'ambdós i, per tant, l'activació de la via Wnt. A causa d'aquesta funció inhibidora, les Sfrp són sovint regulades negativament en diversos processos oncogènics per mitjà de la hipermetilació dels seus promotors gènics (Suzuki *et al.*, 2002). No obstant això, també cal mencionar que segons certes observacions descrites les Sfrp també poden potenciar les accions de les Wnt. Aquest fenomen es creu que tindria lloc especialment quan la concentració de les Sfrp és baixa i la dels receptors de les Wnt elevada, circumstància en la qual, les Sfrp apropiarien les Wnt als seus receptors però no podrien evitar que s'hi unissin (Kawano i Kypta, 2003). En el cas de l'Sfrp4, doncs, podem definir els seus efectes sobre la proliferació cel·lular com a preferentment negatius, tot i que també cal tenir en compte que en certes condicions particulars existeix la possibilitat que actuï de manera inversa.

### Cell growth regulator with EF hand domain 1 (*Cgref1*)

El gen *Cgref1*, també anomenat *Cgr11*, fou identificat com un gen diana del supressor tumoral p53. En una anàlisi d'expressió gènica de fibroblasts embrionaris amb un al·lel de p53 termolàbil, s'observà que *Cgref1* era diferencialment expressat en els fibroblasts que mantenien el factor de transcripció p53 funcional. En aquest estudi també es comprovà que *Cgref1* era capaç d'inhibir el creixement de diverses línies cel·lulars (Madden *et al.*, 1996). Tot i que la informació sobre aquest gen és escassa, les dades

disponibles ens indiquen que té uns efectes sobre la proliferació cel·lular negatius.

#### Growth hormone receptor (Ghr)

Ja s'ha indicat amb anterioritat que aquest gen codifica per a tres formes del receptor de l'hormona del creixement: el receptor de membrana complet (Ghr), un receptor truncat al qual manca el domini intracel·lular (Ghrtr) i una forma secretada d'aquest (Ghbp). Aquesta última, pel fet de ser secretada, era la única de les tres que ens podia interessar per explicar els efectes del medi condicionat.

La Ghbp es troba tant en l'ambient extracel·lular com en la circulació, on actua com a proteïna d'unió a la Gh. La funció biològica concreta de la Ghbp no es coneix amb exactitud, però els estudis sobre el tema suggereixen que modula l'activitat de la Gh. En diversos treballs s'ha demostrat que la Ghbp prolonga la vida mitjana de la Gh en la circulació, de manera que en retardar-ne l'eliminació, en potencia els efectes (Baumann *et al.*, 1987). En aquest sentit, l'administració en rates de la Gh combinada amb la Ghbp provoca una estimulació del creixement més potent que la de la Gh sola (Clark *et al.*, 1996). D'altra banda, la Ghbp també ha demostrat inhibir o atenuar la resposta cel·lular a la Gh en diversos estudis *in vitro* (Lim *et al.*, 1990; Mannor *et al.*, 1991). En preguntar-nos per la possible implicació de la Ghbp en els efectes del medi condicionat, vàrem valorar principalment les seves accions descrites a nivell local, les quals la definien preferentment com a inhibidor de la proliferació.

#### Egf-like domain 7 (Egfl7)

El gen *Egfl7* codifica per a una proteïna secretada que fou identificada per primera vegada en cèl·lules endotelials de ratolí i que ha demostrat que té un paper essencial en la formació dels vasos sanguinis (Parker *et al.*, 2004). La seva expressió és màxima durant el desenvolupament embrionari i neonatal; en els teixits adults és més escassa, tot i que incrementa en resposta al dany vascular o en processos de tumorigènesi. En una publicació recent, l'Egfl7 també ha estat identificada en cèl·lules estem neuronals, on n'inhibeix la proliferació antagonitzant la via de senyalització Noct (Schmidt *et al.*, 2009). En aquest cas, les accions descrites són molt disperses i per això vàrem considerar que Egfl7 podia afectar tant positivament com negativament a la proliferació cel·lular.

#### Pleiotrophin (Ptn)

La Ptn és un factor de creixement i diferenciació cel·lular que, com el seu nom indica, mostra activitats molt diverses. Durant certs estadis del desenvolupament embrionari s'expressa en cèl·lules neuroepiteliales i mesenquimals (Li *et al.*, 1990). En l'adult, la seva expressió és constitutiva i específica d'algunes poblacions cel·lulars (Silos-

Santiago *et al.*, 1996), tot i que augmenta en situacions de dany cel·lular i en processos inflamatoris o de reparació tissular (Zhang *et al.*, 1999). S'ha demostrat que la Ptn estimula la mitogènesi en fibroblasts i en cèl·lules endotelials o epitelials (Fang *et al.*, 1992) i també mostra propietats angiogèniques (Christman *et al.*, 2005). El gen *Ptn* és considerat un protooncogen, ja que es troba desregulat en certs processos d'oncogènesi (Chauhan *et al.*, 1993). En aquest sentit, s'ha descrit la sobreexpressió de *Ptn* en diferents línies cel·lulars d'origen tumoral i s'ha comprovat que el bloqueig de la seva senyalització en cèl·lules de càncer mamari reverteix el fenotip maligne d'aquestes cèl·lules (Zhang *et al.*, 1997). En conclusió, les accions de la Ptn sobre la proliferació cel·lular poden ser considerades com a positives.

### Clusterin (Clu)

El gen de la clusterina codifica per a dues formes d'aquesta proteïna amb funcions oposades. Una és glicosilada i secretada (sClu), i l'altra, produïda per *splicing* diferencial, es localitza en el citoplasma i el nucli cel·lular (nClu). Mentre que la primera mostra propietats protectores per a la cèl·lula, la segona actua com a senyal proapoptòtic i inhibeix la proliferació cel·lular. A causa de la seva estimulació de la supervivència cel·lular, la sClu és induïda en resposta a diferents agents citotòxics (Djeu i Wei, 2009). També s'observa que n'hi ha una major producció en cèl·lules tumorals de càncer de pròstata i de mama en estadis avançats i amb pronòstic desfavorable (Redondo *et al.*, 2000; Steinberg *et al.*, 1997). Segons alguns autors, certs processos oncogènics implicarien un canvi d'expressió de la Clu nuclear a la secretada com a mecanisme de supervivència de les cèl·lules tumorals (Pucci *et al.*, 2004). La forma secretada de la Clu era la única que ens interessava a l'hora d'explicar les propietats proliferatives del medi condicionat, en referència a aquesta, hem de dir que no podem assegurar la seva estimulació de la proliferació però sí de la supervivència cel·lular.

### Insulin-like growth factor binding protein 3 (Igfbp3)

En la introducció d'aquesta tesi ja hem dedicat un apartat a la Igfbp3 i als factors de creixement que regula, els Igf. La Igfbp3, modula l'activitat dels Igf, ja que funciona com a proteïna d'unió a aquests, tant en la circulació com en l'ambient extracel·lular. Com en el cas de la Ghbp, l'efecte de la Igfbp3 sobre els Igf és dual. En actuar com a proteïna transportadora dels Igf en la circulació, en promou els efectes retardant la seva eliminació, però també els inhibeix impedint que accedeixin als teixits. Localment, la Igfbp3, com la resta de les Igfbp, actua preferentment impedint la unió dels Igf als seus receptors, i per tant, inhibint les seves accions (Yamada i Lee, 2009). La Igfbp3, a més, també ha demostrat que du a terme accions proapoptòtiques i antiproliferatives en les

quals no estan implicats els IGF. A l'hora de valorar la Igfbp3 com a possible factor responsable dels efectes del medi condicionat, la considerarem un agent preferentment antimitòtic, tant per les seves accions inhibidores dels IGF en l'àmbit local, com per les que exerceix independentment dels IGF.

#### Growth differentiation factor 10 (Gdf10)

La proteïna codificada per aquest gen és un membre de la família de les *Bone morphogenic protein* (Bmp), motiu pel qual també rep el nom de *Bone morphogenic protein 3b* (Bmp3b). Les Bmp pertanyen a la superfamília del TGF- $\beta$  i són citocines multifuncionals que participen en el desenvolupament i el creixement ossi, i també es troben implicades en l'organogènesi, particularment de l'intestí, el cor i el ronyó (Hino *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2007). A causa de les seves propietats antiproliferatives, les Bmp intervenen en certs processos oncogènics, en els quals són inactivades mitjançant la hipermetilació dels seus promotors. En concret, el gen *Gdf10* és inactivat en certs tipus de càncers colonorectals i d'intestí (Dai *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2004). En conjunt, aquestes dades ens permeten definir *Gdf10* com un factor antiproliferatiu.

També cal destacar que per a alguns d'aquests gens s'han descrit certs efectes directes sobre la proliferació o la diferenciació de la cèl·lula beta. Un exemple és el de la leptina, la qual ha demostrat que estimula la replicació de certes línies de cèl·lula beta (Islam *et al.*, 1997; Tanabe *et al.*, 1997). Un altre dels factors seleccionats, la clusterina, s'expressa en els ductes pancreàtics durant la regeneració posterior a una pancreatectomia o al tractament amb STZ, motiu pel qual se l'ha implicat en el procés de la neogènesi (Kim *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2003). En el cas d'Igfbp3, també s'ha demostrat que pot actuar directament sobre una línia de cèl·lula beta inhibint-ne la proliferació (Chen i Ferry, 2006; Shim *et al.*, 2004). En altres casos, encara que el seu efecte sobre la cèl·lula beta no hagi estat demostrat directament, es pot considerar possible, ja que existeix una evidència clara que certs factors amb els quals interactuen, o la via a la qual pertanyen, sí que es troben implicats en la diferenciació o la proliferació de la cèl·lula beta. Així, per exemple, aquesta implicació es troba completament establerta en el cas de la Gh (Liu *et al.*, 2004; Parsons *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 1983), l'activitat de la qual pot ser modulada per la Ghbp (isoforma del Ghr) (Amit *et al.*, 2000), i per la via de les Wnt (Papadopoulou i Edlund, 2005; Rulifson *et al.*, 2007), a la qual pertany l'Sfrp4 (Kawano i Kypta, 2003).

Una vegada realitzada aquesta primera selecció de gens, procedirem a verificar el seu patró d'expressió en teixit adipós pMES, obtingut en l'anàlisi per microarrays, mitjançant PCR quantitativa. A continuació, tenint en compte que el medi condicionat

pMES era l'únic que induïa una proliferació diferent en les cèl·lules beta quan procedia de rates control o de cafeteria, comprovarem que l'expressió diferencial de cada gen entre aquests dos grups fos també exclusiva del teixit pMES, i que no es presentés en els teixits eWAT o iSUB. Únicament dos gens, l'*Sfrp4* i l'*Igfbp3*, compliren aquesta condició:

El gen *Sfrp4* pertany a una família d'antagonistes de la via Wnt, i com a tal, actua com a repressor de la replicació cel·lular. Aquest paper antiproliferatiu de l'*Sfrp4* és el que ens va fer desistir d'estudiar més a fons la seva implicació en els efectes del medi condicionat, ja que era difícil explicar com podia mitjançar aquests efectes quan es trobava sobreexpressat precisament en el teixit adipós d'on derivava el medi condicionat més mitogènic (el pMES de rates obeses). No obstant això, com ja s'ha esmentat prèviament i segons indiquen certes observacions descrites, algunes *Sfrp* també poden potenciar els efectes de les Wnt (Kawano i Kypta, 2003) i, per tant, estimular la replicació cel·lular. En aquest sentit, s'ha comprovat que el gen *Sfrp4* es troba sobreexpressat en certs tipus de càncer (Feng Han *et al.*, 2006). Tenint en compte els efectes positius sobre la proliferació que suggereixen aquests estudis, sí que podríem considerar l'*Sfrp4* com a possible factor responsable dels efectes del medi condicionat pMES.

Aquesta implicació de l'*Sfrp4* també seria recolzada per la relació existent entre la via Wnt, la cèl·lula beta i la diabetis. Diferents membres de la via Wnt s'expressen en el pàncrees i el seu bloqueig o activació causa alteracions en el desenvolupament pancreàtic (Welters i Kulkarni, 2008). La via Wnt també es troba activa en la cèl·lula beta i ha estat comprovada la seva participació tant en la replicació i supervivència d'aquesta com en la secreció d'insulina (Welters i Kulkarni, 2008). En aquest sentit, cal destacar l'estudi ja mencionat anteriorment, on s'identifiquen certs lligands de la via Wnt com a responsables dels efectes proliferatius d'un medi condicionat de teixit adipós sobre la línia cel·lular beta INS1 (Schinner *et al.*, 2008).

L'expressió de components de la via Wnt també ha estat prèviament descrita en teixit adipós. En aquest teixit, al contrari que en d'altres, l'activació de la via Wnt no n'estimula la diferenciació, sinó que la bloqueja. De fet, la inhibició de la via Wnt és un requisit necessari per a la diferenciació adipocitària (Ross *et al.*, 2000). S'ha demostrat que l'activació constitutiva d'aquesta via manté els preadipòcits en un estat indiferenciat (Christodoulides *et al.*, 2006; Longo *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002) i el transgènic d'un dels seus lligands, *Wnt10b*, mostra una reducció important de l'adipositat (Longo *et al.*, 2004). Dins del context del teixit adipós, la sobreexpressió de l'*Sfrp4* en el teixit pMES que detectem en el nostre model en resposta a l'obesitat tindria sentit ja que podria tractar-se d'un mecanisme compensatori en el qual els nivells de l'*Sfrp4* incrementarien per inhibir la via Wnt i estimular l'adipogènesi.

Les diverses accions de la via Wnt en cèl·lula beta i també en teixit adipós ja deixen entreveure l'important paper que desenvolupa en el metabolisme de la glucosa. Aquest fet, però, encara ha estat més evident en descriure's l'associació de diversos polimorfismes del gen *TCF7L2*, un dels factors de transcripció diana de la via Wnt, amb un major risc de desenvolupar la DM2 (Grant *et al.*, 2006). La causa d'aquesta associació, que ha estat corroborada en diferents grups ètnics (Cauchi *et al.*, 2007; Cauchi *et al.*, 2006; Hayashi *et al.*, 2007), encara no s'ha definit. Tanmateix, els estudis sobre el tema apunten GLP1 com a factor implicat, ja que s'ha comprovat que *TCF7L2* mitjança l'activació de l'expressió del gen proglucagó (el precursor de GLP1) en les cèl·lules enteroendocrines (Ni *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2005) i també els efectes proliferatius de GLP1 en la cèl·lula beta (Liu i Habener, 2008).

Tot i que l'*Sfrp4* ens va semblar un gen candidat interessant, finalment vàrem decidir no centrar el nostre estudi en ell per dos motius principals. En primer lloc, perquè en trobar-se sobreexpressat en el teixit adipós pMES de rates obesas, només podia dur a terme els efectes proliferatius del seu medi condicionat actuant com a factor mitòtic. I aquesta possibilitat semblava poc probable, tenint en compte que les accions d'*Sfrp4* més constatades són antiproliferatives i no mitòtiques. I en segon lloc, perquè, com s'indica en l'apartat anterior, els experiments de desactivació del medi condicionat pMES senyalaven un inhibidor i no un inductor de la proliferació com a responsable dels seus efectes.

Per tant, el gen candidat en el qual finalment enfocàrem el nostre estudi fou el de la *Igfbp3*, el qual consideràrem que era adequat per diverses raons. En primer lloc, perquè la *Igfbp3* és descrita preferentment com a una inhibidora de la proliferació (sobretot localment, que és com hauria d'actuar en el nostre model *in vitro*) (Yamada i Lee, 2009), i aquesta funció sí que feia possible explicar l'augment de la proliferació induïda pel medi pMES de rates obesas, a partir de la menor expressió d'*Igfbp3* en el seu teixit de procedència. En segon lloc, perquè la implicació d'un factor inhibidor de la proliferació en els efectes del medi condicionat pMES també era la que es deduïa a partir dels experiments de desactivació d'aquest medi condicionat. Finalment, l'elecció d'*Igfbp3* també fou motivada per la descripció prèvia de les seves accions antiproliferatives directes sobre la cèl·lula beta (Chen i Ferry, 2006; Shim *et al.*, 2004) i la possibilitat que també les pogués dur a terme modulant els efectes dels IGF, els quals es troben també implicats de manera molt important en la diferenciació i el creixement de la cèl·lula beta.



#### 4. IMPLICACIÓ DE LA IGFBP3 EN L'EFECTE DEL TEIXIT ADIPÓS PANCREÀTIC MESENTÈRIC SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA BETA

En l'estudi d'Igfbp3 dut a terme, vàrem poder demostrar en primer lloc, que tant la seva expressió gènica com proteica era reduïda de manera específica en el teixit adipós pMES per la dieta de cafeteria. Una reducció, que com ja hem indicat anteriorment i tenint en compte les accions antiproliferatives descrites per a la Igfbp3, podia justificar la major replicació causada pel medi condicionat pMES de rates obeses. En segon lloc, tot i que no vàrem aconseguir quantificar la Igfbp3 en el medi condicionat pMES, sí que l'hi detectàrem i, a més, vàrem demostrar que afegint-la o bloquejant-la es modificaven els efectes d'aquest medi sobre la replicació de les cèl·lules INS1E. D'acord altra vegada amb les seves accions antimitòtiques, observàrem que la proliferació induïda pel medi incrementava quan la Igfbp3 era neutralitzada mitjançant un anticòs específic i que disminuïa quan afegíem la seva proteïna recombinant. En conclusió, doncs, aquests resultats donaven suport a la implicació d'Igfbp3 en els efectes del medi condicionat pMES.

La Igfbp3 pot dur a terme les seves accions antiproliferatives de manera dependent o independent dels Igf (Yamada i Lee, 2009). A partir dels nostres estudis preliminars no és possible concretar per quina d'aquestes vies, mitjança els efectes del medi condicionat, tot i que *a priori*, totes dues serien possibles. D'una banda, vàrem observar que el teixit adipós pMES expressava i secretava Igf1 al medi condicionat; per tant, la Igfbp3 podria inhibir la replicació de les cèl·lules beta segregant l'Igf1 present en el medi. Aquest mecanisme d'acció de la Igfbp3 lligat als Igf resulta interessant, atesa la implicació d'aquests últims en el desenvolupament i la proliferació de la cèl·lula beta. Com hem explicat en la introducció, diversos estudis han demostrat que els Igf són capaços d'estimular la proliferació i la supervivència de la cèl·lula beta en diferents condicions (Dickson *et al.*, 2001; George *et al.*, 2002; Hogg *et al.*, 1993; Hugl *et al.*, 1998; Lingohr *et al.*, 2002; Petrik *et al.*, 1999; Sieradzki *et al.*, 1988) i més concretament l'Igf1 ha estat relacionat per diversos autors amb el procés d'expansió de la massa de cèl·lula beta que es dona en resposta a la resistència a insulina (Assmann *et al.*, 2009; Escribano *et al.*, 2009; Ueki *et al.*, 2006).

Com ja s'ha esmentat anteriorment la Igfbp3 pot actuar de forma independent dels Igf, participant en altres vies de senyalització i interaccionant amb multitud de factors. Per exemple, pot unir-se a receptors de membrana propis i ser internalitzada fins al nucli on s'associa als receptors nuclears de l'àcid retinoic, RXR i RAR (Yamada i Lee, 2009). Per

tant, l'altra opció en la qual la Igfbp3 del medi condicionat inhibiria la replicació de les cèl·lules INS1E sense la intervenció dels Igf, també seria possible i més tenint en compte que aquest fet ja ha estat descrit prèviament en una línia de cèl·lules beta, les RIN (Chen i Ferry, 2006). Aquest efecte antiproliferatiu directe de la Igfbp3 també és el que es pot interpretar a partir dels assaigs de proliferació que realitzarem afegint la proteïna Igfbp3 recombinant a un medi de cultiu no condicionat. Tanmateix, cal dir que en aquest cas, no podem descartar totalment la implicació dels Igf, ja que, en emprar un medi no condicionat, vàrem eliminar d'aquest els Igf derivats del teixit adipós però no de les mateixes cèl·lules INS1E que cultivàvem. De fet, l'expressió dels Igf ha estat descrita en la línia cel·lular INS1, de la qual deriven les INS1E (Asfari *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2002).

La Igfbp3 no només participa en processos de proliferació i apoptosi cel·lular sinó que també té un paper en el metabolisme de la glucosa, com evidencien els models genètics que se n'han realitzat. Tant el fenotip del transgènic específic de la Igfbp3 com el del *knockout* múltiple de la Igfbp3, la Igfbp4 i la Igfbp5 mostren un retard en el creixement, a més d'alteracions en el metabolisme de la glucosa (vegeu l'apartat 4.3 de la introducció). La sobreexpressió de la Igfbp3 provoca intolerància a glucosa i una menor captació de glucosa pel teixit adipós i el múscul en resposta a insulina (Silha *et al.*, 2002). En canvi, en el *knockout* múltiple de la Igfbp3, la Igfbp4 i la Igfbp5, s'observa una millora del metabolisme glucídic respecte als animals control (Ning *et al.*, 2006). En aquest últim, cal destacar que hi té lloc un increment del 37% en el percentatge d'àrea d'insulina del pàncrees, cosa que indica una expansió de la massa de cèl·lula beta. Aquesta expansió no respon a una major resistència a insulina, ja que els *knockouts* precisament mostren una major sensibilitat a insulina. Encara que aquesta observació és de difícil interpretació, una possible explicació a favor de la implicació de la Igfbp3 en la regulació de la proliferació de la cèl·lula beta seria que l'absència de les Igfbp en els *knockouts* potenciarà l'efecte dels Igf sobre la cèl·lula beta o en promouria la replicació en independència d'aquests.

En els efectes metabòlics de la Igfbp3 també hi tenen molt a veure les seves accions en teixit adipós. En l'anàlisi d'expressió gènica que realitzarem per a Igf1 i Igfbp3 en teixit adipós fraccionat, vàrem poder observar que, així com l'Igf1 s'expressava preferentment en els adipòcits, la Igfbp3 ho feia en la fracció estromal. Aquest patró d'expressió és també el que ha estat descrit prèviament (Peter *et al.*, 1993). La funció de l'Igf1 i la Igfbp3 en teixit adipós no es coneix amb exactitud, tot i que els estudis al respecte indiquen que hi poden actuar de manera autocrina o paracrina regulant la diferenciació i la funció dels adipòcits. De fet, s'ha demostrat que l'Igf1 promou l'adipogènesi (MacDougald i Lane, 1995), mentre la Igfbp3 inhibeix la diferenciació dels adipòcits, a més de la seva captació de glucosa (Chan *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2005).

Basant-se en aquestes observacions, alguns autors han suggerit que la Igfbp3 podria tenir un paper important en el desenvolupament de la resistència a insulina associada a l'obesitat (Baxter i Twigg, 2009). Segons aquesta idea, la Igfbp3 podria ser induïda per l'obesitat i contribuir al desenvolupament de resistència a insulina, promovent-la directament en el teixit adipós en inhibir la captació de glucosa per aquest, o de manera indirecta en altres teixits en inhibir l'adipogènesi i afavorir l'acumulació ectòpica de lípids. Els nostres resultats, però, no donen suport a aquesta hipòtesi, ja que, en els dipòsits de teixit adipós que hem analitzat l'obesitat no només no produeix una sobreexpressió de la Igfbp3 sinó que, a més, en un d'ells, el pMES, la redueix.

Les dades del nostre estudi indiquen que l'alliberació d'Igfbp3 pel teixit adipós pot modular la proliferació de la cèl·lula beta. No obstant això, les condicions *in vitro* amb les quals hem treballat fan difícil extrapolar els resultats obtinguts a un model *in vivo*. Si ho fem se'ns planteja principalment una qüestió: com poden entrar en contacte amb la cèl·lula beta els factors derivats del teixit adipós, o més concretament la Igfbp3, per modificar-ne la proliferació? En el cas de la Igfbp3 (o els Igf, si aquesta última actua modulant la seva acció) una possible via d'accés al pàncrees seria l'endocrina. Els Igf i les seves proteïnes d'unió foren caracteritzats inicialment com a factors endocrins secretats pel fetge en resposta a l'estímul de l'hormona del creixement; tanmateix, posteriorment s'ha vist que també són produïts i secretats per la majoria dels teixits (Le Roith *et al.*, 2001a; Le Roith *et al.*, 2001b). Entre aquests teixits, com ja hem indicat prèviament, s'hi troba l'adipós, on l'expressió d'Igfbp3 és més aviat moderada, comparada amb la del fetge o altres teixits. Respecte a l'Igf1, la seva expressió en teixit adipós ha estat descrita com a més aviat baixa o tan elevada com la del fetge, segons diferents autors (Albiston i Herington, 1992; Gosteli-Peter *et al.*, 1994).

Tot i que la contribució per part dels teixits extrahepàtics a les concentracions plasmàtiques d'Igf1 i d'Igfbp3 és relativament baixa (Yakar *et al.*, 1999; Yakar *et al.*, 2002), ens va semblar interessant comprovar si l'obesitat que desenvolupava el nostre model de rata de cafeteria causava alguna modificació en aquestes concentracions, ja fos a través de la producció en teixit adipós o per altres vies. En mesurar els nivells d'Igfbp3 en sèrum no detectàrem canvis entre les rates obeses i control, i en el cas d'Igf1, comprovàrem que la seva concentració no només no augmentava en resposta a l'obesitat sinó que mostrava una lleugera però significativa disminució. Aquests resultats ens indicaren d'una banda, que la contribució del teixit adipós pMES a la concentració circulat d'Igfbp3 era discreta comparada amb la del fetge o altres teixits, i de l'altra, que l'única via per explicar les accions d'Igfbp3 sobre la cèl·lula beta *in vivo* era la paracrina.

El dipòsit adipós pMES, l'únic que segons els nostres resultats secreta factors que poden modular la replicació de les cèl·lules beta en resposta a l'obesitat, es troba

precisament envoltant el pàncrees; per tant, una acció paracrina de la Igfbp3 derivada d'aquest teixit adipós sobre les cèl·lules beta seria possible. Un altre argument a favor d'aquesta idea és que en la caracterització morfològica del pàncrees del nostre model d'obesitat vàrem detectar un cert grau d'infiltració de teixit adipós en el teixit pancreàtic, i també adipòcits en estret contacte amb illots pancreàtics. Aquesta infiltració, que ha estat prèviament descrita en altres estudis (Olsen, 1978; Pinnick *et al.*, 2008; Ulgen *et al.*, 2008), encara faria més plausible un mecanisme d'acció paracrí d'Igfbp3 sobre les cèl·lules beta, encara que, òbviament, caldria ampliar els nostres estudis per poder verificar aquesta hipòtesi.

En conclusió, podem afirmar que els resultats que hem obtingut apunten la Igfbp3 com a responsable dels efectes del medi condicionat pMES sobre la proliferació de la cèl·lula beta. Aquests, suggereixen un nou paper de la Igfbp3 com a moduladora de la plasticitat de la cèl·lula beta en l'obesitat, en el qual la Igfbp3 secretada pel teixit adipós que envolta el pàncrees actuaria de forma paracrina sobre les cèl·lules beta. La implicació descrita prèviament de la Igfbp3 en processos de proliferació i en el metabolisme de la glucosa, donarien suport també a una funció d'aquesta com a moduladora de la proliferació de la cèl·lula beta, tant actuant com a proteïna d'unió als Igf com de manera independent d'aquests.



## **VI. CONCLUSIONS**



## **CONCLUSIONS**

1. La hiperinsulinèmia del model d'obesitat induït per dieta de cafeteria és mitjançada en part per una expansió de la massa de cèl·lula beta. Aquesta expansió es dona com a conseqüència d'un increment de la replicació de la cèl·lula beta de manera sostinguda des dels 10 fins als 60 dies de dieta, i d'una hipertròfia de la mateixa a partir dels 30 dies de dieta.
2. El medi condicionat del teixit adipós pMES és l'únic que en resposta a l'obesitat induïx un increment en la proliferació de la cèl·lula beta. Aquests efectes no són potenciats per la glucosa, i els factors que en són responsables són de naturalesa termolàbil i actuen preferentment com a inhibidors de la proliferació.
3. El gen *Igfbp3* és l'únic que codifica per a una proteïna secretable, mostra una expressió diferencial en resposta a l'obesitat i específica del teixit adipós pMES i pot explicar els efectes del medi condicionat d'aquest teixit, atesa la seva funció antiproliferativa.
4. Tant l'expressió gènica com proteica d'Igfbp3 és reduïda per l'obesitat de manera específica en el teixit adipós pMES. Aquests canvis en l'expressió d'Igfbp3 en teixit adipós no comporten canvis en la seva concentració circulant.
5. La Igfbp3 es detecta en el medi condicionat pMES. El bloqueig d'Igfbp3 en aquest medi provoca un increment de la proliferació de la cèl·lula beta i la seva addició exògena la redueix. Per tant, demostrem que la Igfbp3 es troba implicada en els efectes del medi condicionat pMES sobre la proliferació de la cèl·lula beta.
6. Els resultats exposats suggereixen un nou paper de la Igfbp3 com a moduladora de la plasticitat de la cèl·lula beta en l'obesitat, en el qual seria secretada pel teixit adipós que envolta el pàncrees i actuaria de forma paracrina sobre la proliferació de les cèl·lules beta.





## VII. BIBLIOGRAFIA



- Ackermann, A. M., and Gannon, M. (2007). Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 38, 193-206.
- ADA, A. D. A. (2008). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 31 *Suppl 1*, S55-60.
- Adams, M., Montague, C. T., Prins, J. B., Holder, J. C., Smith, S. A., Sanders, L., Digby, J. E., Sewter, C. P., Lazar, M. A., Chatterjee, V. K., and O'Rahilly, S. (1997). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100, 3149-3153.
- AffymetrixInc GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals. [https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data\\_analysis\\_fundamentals\\_manual.pdf](https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf).
- Albiston, A. L., and Herington, A. C. (1992). Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid (mRNA) in the rat: comparison with IGF-I mRNA expression. *Endocrinology* 130, 497-502.
- Altirriba, J., Barbera, A., Del Zotto, H., Nadal, B., Piquer, S., Sanchez-Pla, A., Gagliardino, J. J., and Gomis, R. (2009). Molecular mechanisms of tungstate-induced pancreatic plasticity: a transcriptomics approach. *BMC Genomics* 10, 406.
- Amit, T., Bergman, T., Dastot, F., Youdim, M. B., Amselem, S., and Hochberg, Z. (1997). A membrane-fixed, truncated isoform of the human growth hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3813-3817.
- Amit, T., Youdim, M. B., and Hochberg, Z. (2000). Clinical review 112: Does serum growth hormone (GH) binding protein reflect human GH receptor function? *J Clin Endocrinol Metab* 85, 927-932.
- Araki, E., Lipes, M. A., Patti, M. E., Bruning, J. C., Haag, B., 3rd, Johnson, R. S., and Kahn, C. R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372, 186-190.
- Arner, P. (2001). Regional differences in protein production by human adipose tissue. *Biochem Soc Trans* 29, 72-75.
- Arner, P. (2002). Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev* 18 *Suppl 2*, S5-9.
- Asfari, M., De, W., Noel, M., Holthuisen, P. E., and Czernichow, P. (1995). Insulin-like growth factor-II gene expression in a rat insulin-producing beta-cell line (INS-1) is regulated by glucose. *Diabetologia* 38, 927-935.
- Assmann, A., Ueki, K., Winnay, J. N., Kadowaki, T., and Kulkarni, R. N. (2009). Glucose effects on beta-cell growth and survival require activation of insulin receptors and insulin receptor substrate 2. *Mol Cell Biol* 29, 3219-3228.

## Bibliografia

Barandier, C., Montani, J. P., and Yang, Z. (2005). Mature adipocytes and perivascular adipose tissue stimulate vascular smooth muscle cell proliferation: effects of aging and obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H1807-1813.

Baumann, G., Amburn, K. D., and Buchanan, T. A. (1987). The effect of circulating growth hormone-binding protein on metabolic clearance, distribution, and degradation of human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 64, 657-660.

Baumbach, W. R., Horner, D. L., and Logan, J. S. (1989). The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes Dev* 3, 1199-1205.

Baxter, R. C., and Twigg, S. M. (2009). Actions of IGF binding proteins and related proteins in adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* 20, 499-505.

Beck, J. C., and Hosick, H. L. (1988). Growth of mouse mammary epithelium in response to serum-free media conditioned by mammary adipose tissue. *Cell Biol Int Rep* 12, 85-97.

Beck, J. C., Hosick, H. L., and Watkins, B. A. (1989). Growth of epithelium from a preneoplastic mammary outgrowth in response to mammary adipose tissue. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 409-418.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc (Ser B)* 57, 289-300.

Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C. M., and Permutt, M. A. (2001). Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest* 108, 1631-1638.

Bernard-Kargar, C., and Ktorza, A. (2001). Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. *Diabetes* 50 Suppl 1, S30-35.

Bjorbaek, C., and Kahn, B. B. (2004). Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59, 305-331.

Bjorntorp, P. (1974). Size, number and function of adipose tissue cells in human obesity. *Horm Metab Res Suppl* 4, 77-83.

Blume, N., Skouv, J., Larsson, L. I., Holst, J. J., and Madsen, O. D. (1995). Potent inhibitory effects of transplantable rat glucagonomas and insulinomas on the respective endogenous islet cells are associated with pancreatic apoptosis. *J Clin Invest* 96, 2227-2235.

Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M., and Speed, T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185-193.

Bonner-Weir, S., Baxter, L. A., Schuppin, G. T., and Smith, F. E. (1993). A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42, 1715-1720.

Bonner-Weir, S., Deery, D., Leahy, J. L., and Weir, G. C. (1989). Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38, 49-53.

Bouwens, L. (1998). Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microsc Res Tech* 43, 332-336.

Bouwens, L., and Kloppel, G. (1996). Islet cell neogenesis in the pancreas. *Virchows Arch* 427, 553-560.

Bouwens, L., and Pipeleers, D. G. (1998). Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia* 41, 629-633.

Bouwens, L., and Rومان, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev* 85, 1255-1270.

Bouwens, L., Wang, R. N., De Blay, E., Pipeleers, D. G., and Kloppel, G. (1994). Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 43, 1279-1283.

Breant, B., Gesina, E., and Blondeau, B. (2006). Nutrition, glucocorticoids and pancreas development. *Horm Res* 65 Suppl 3, 98-104.

Brelje, T. C., Scharp, D. W., Lacy, P. E., Ogren, L., Talamantes, F., Robertson, M., Friesen, H. G., and Sorenson, R. L. (1993). Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* 132, 879-887.

Brown, J., Heininger, D., Kuret, J., and Mullen, Y. (1981). Islet cells grow after transplantation of fetal pancreas and control of diabetes. *Diabetes* 30, 9-13.

Buckway, C. K., Wilson, E. M., Ahlsen, M., Bang, P., Oh, Y., and Rosenfeld, R. G. (2001). Mutation of three critical amino acids of the N-terminal domain of IGF-binding protein-3 essential for high affinity IGF binding. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4943-4950.

Buteau, J., El-Assaad, W., Rhodes, C. J., Rosenberg, L., Joly, E., and Prentki, M. (2004). Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipototoxicity. *Diabetologia* 47, 806-815.

Buteau, J., Foisy, S., Joly, E., and Prentki, M. (2003). Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* 52, 124-132.

Buteau, J., Foisy, S., Rhodes, C. J., Carpenter, L., Biden, T. J., and Prentki, M. (2001). Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 50, 2237-2243.

## Bibliografia

Butler, A. E., Janson, J., Soeller, W. C., and Butler, P. C. (2003). Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52, 2304-2314.

Cauchi, S., El Achhab, Y., Choquet, H., Dina, C., Krempler, F., Weitgasser, R., Nejjari, C., Patsch, W., Chikri, M., Meyre, D., and Froguel, P. (2007). TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *J Mol Med* 85, 777-782.

Cauchi, S., Meyre, D., Dina, C., Choquet, H., Samson, C., Gallina, S., Balkau, B., Charpentier, G., Pattou, F., Stetsyuk, V., *et al.* (2006). Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes* 55, 2903-2908.

Chan, J. M., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., and Willett, W. C. (1994). Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 17, 961-969.

Chan, S. S., Schedlich, L. J., Twigg, S. M., and Baxter, R. C. (2009). Inhibition of adipocyte differentiation by insulin-like growth factor-binding protein-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E654-663.

Chan, S. S., Twigg, S. M., Firth, S. M., and Baxter, R. C. (2005). Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6588-6595.

Chandran, M., Phillips, S. A., Ciaraldi, T., and Henry, R. R. (2003). Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26, 2442-2450.

Chauhan, A. K., Li, Y. S., and Deuel, T. F. (1993). Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 679-682.

Chen, M. P., Chung, F. M., Chang, D. M., Tsai, J. C., Huang, H. F., Shin, S. J., and Lee, Y. J. (2006). Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 295-299.

Chen, X., and Ferry, R. J., Jr. (2006). Novel actions of IGFBP-3 on intracellular signaling pathways of insulin-secreting cells. *Growth Horm IGF Res* 16, 41-48.

Choi, S. E., Choi, K. M., Yoon, I. H., Shin, J. Y., Kim, J. S., Park, W. Y., Han, D. J., Kim, S. C., Ahn, C., Kim, J. Y., *et al.* (2004). IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transpl Immunol* 13, 43-53.

Christman, K. L., Fang, Q., Kim, A. J., Sievers, R. E., Fok, H. H., Candia, A. F., Colley, K. J., Herradon, G., Ezquerro, L., Deuel, T. F., and Lee, R. J. (2005). Pleiotrophin induces formation of functional neovasculature in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 1146-1152.

Christodoulides, C., Laudes, M., Cawthorn, W. P., Schinner, S., Soos, M., O'Rahilly, S., Sethi, J. K., and Vidal-Puig, A. (2006). The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *J Cell Sci* 119, 2613-2620.

Cinti, S. (2001). The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc* 60, 319-328.

Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 9-15.

Cinti, S. (2006). The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16, 569-574.

Claret, M., Corominola, H., Canals, I., Nadal, B., Chavanieu, A., Pfeiffer, B., Renard, P., Gorostiaga, C., Delagrangé, P., Grassy, G., and Gomis, R. (2004). S 23521 decreases food intake and body weight gain in diet-induced obese rats. *Obes Res* 12, 1596-1603.

Claret, M., Corominola, H., Canals, I., Saura, J., Barcelo-Batllo, S., Guinovart, J. J., and Gomis, R. (2005). Tungstate decreases weight gain and adiposity in obese rats through increased thermogenesis and lipid oxidation. *Endocrinology* 146, 4362-4369.

Clark, R. G., Mortensen, D. L., Carlsson, L. M., Spencer, S. A., McKay, P., Mulkerrin, M., Moore, J., and Cunningham, B. C. (1996). Recombinant human growth hormone (GH)-binding protein enhances the growth-promoting activity of human GH in the rat. *Endocrinology* 137, 4308-4315.

Coatmellec-Taglioni, G., Dausse, J. P., Ribiere, C., and Giudicelli, Y. (2000). Hypertension in cafeteria-fed rats: alterations in renal alpha2-adrenoceptor subtypes. *Am J Hypertens* 13, 529-534.

Colombo, C., Cutson, J. J., Yamauchi, T., Vinson, C., Kadowaki, T., Gavrilova, O., and Reitman, M. L. (2002). Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipoatrophy. *Diabetes* 51, 2727-2733.

Conover, C. A., and Powell, D. R. (1991). Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 blocks IGF-I-induced receptor down-regulation and cell desensitization in cultured bovine fibroblasts. *Endocrinology* 129, 710-716.

Cooper, S. C., and Roncari, D. A. (1989). 17-beta-estradiol increases mitogenic activity of medium from cultured preadipocytes of massively obese persons. *J Clin Invest* 83, 1925-1929.

Coppack, S. W., Jensen, M. D., and Miles, J. M. (1994). In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res* 35, 177-193.

Coppiari, R., Ichinose, M., Lee, C. E., Pullen, A. E., Kenny, C. D., McGovern, R. A., Tang, V., Liu, S. M., Ludwig, T., Chua, S. C., Jr., *et al.* (2005). The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab* 1, 63-72.



## Bibliografia

Cousin, S. P., Hugl, S. R., Myers, M. G., Jr., White, M. F., Reifel-Miller, A., and Rhodes, C. J. (1999). Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction via janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling. *Biochem J* 344 Pt 3, 649-658.

Covey, S. D., Wideman, R. D., McDonald, C., Unniappan, S., Huynh, F., Asadi, A., Speck, M., Webber, T., Chua, S. C., and Kieffer, T. J. (2006). The pancreatic beta cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metab* 4, 291-302.

Dai, Z., Lakshmanan, R. R., Zhu, W. G., Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Fruhwald, M. C., Brena, R. M., Li, B., Wright, F. A., Ross, P., *et al.* (2001). Global methylation profiling of lung cancer identifies novel methylated genes. *Neoplasia* 3, 314-323.

Dai, Z., Popkie, A. P., Zhu, W. G., Timmers, C. D., Raval, A., Tannehill-Gregg, S., Morrison, C. D., Auer, H., Kratzke, R. A., Niehans, G., *et al.* (2004). Bone morphogenetic protein 3B silencing in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 23, 3521-3529.

Dastot, F., Duquesnoy, P., Sobrier, M. L., Goossens, M., and Amselem, S. (1998). Evolutionary divergence of the truncated growth hormone receptor isoform in its ability to generate a soluble growth hormone binding protein. *Mol Cell Endocrinol* 137, 79-84.

Dastot, F., Sobrier, M. L., Duquesnoy, P., Duriez, B., Goossens, M., and Amselem, S. (1996). Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10723-10728.

De Leon, D. D., Deng, S., Madani, R., Ahima, R. S., Drucker, D. J., and Stoffers, D. A. (2003). Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. *Diabetes* 52, 365-371.

de Souza, C. J., Eckhardt, M., Gagen, K., Dong, M., Chen, W., Laurent, D., and Burkey, B. F. (2001). Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 50, 1863-1871.

Despres, J. P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881-887.

Dickson, L. M., Lingohr, M. K., McCuaig, J., Hugl, S. R., Snow, L., Kahn, B. B., Myers, M. G., Jr., and Rhodes, C. J. (2001). Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 276, 21110-21120.

Dickson, L. M., and Rhodes, C. J. (2004). Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E192-198.

Diez, J. J., and Iglesias, P. (2003). The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148, 293-300.

DiGirolamo, M., Fine, J. B., Tagra, K., and Rossmanith, R. (1998). Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* 274, R1460-1467.

Djeu, J. Y., and Wei, S. (2009). Clusterin and chemoresistance. *Adv Cancer Res* 105, 77-92.

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., and Melton, D. A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41-46.

Dupont, J., and LeRoith, D. (2001). Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm Res* 55 Suppl 2, 22-26.

Duvillie, B., Currie, C., Chrones, T., Bucchini, D., Jami, J., Joshi, R. L., and Hill, D. J. (2002). Increased islet cell proliferation, decreased apoptosis, and greater vascularization leading to beta-cell hyperplasia in mutant mice lacking insulin. *Endocrinology* 143, 1530-1537.

Edens, A., Southard, J. N., and Talamantes, F. (1994). Mouse growth hormone-binding protein and growth hormone receptor transcripts are produced from a single gene by alternative splicing. *Endocrinology* 135, 2802-2805.

Edens, A., and Talamantes, F. (1998). Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr Rev* 19, 559-582.

Eldor, R., and Raz, I. (2006). Lipotoxicity versus adipotoxicity - the deleterious effects of adipose tissue on beta cells in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 74, S3-S8.

Elghazi, L., Balcazar, N., and Bernal-Mizrachi, E. (2006). Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 157-163.

Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbaek, C., Flier, J. S., Saper, C. B., and Elmquist, J. K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23, 775-786.

Escribano, O., Guillen, C., Nevado, C., Gomez-Hernandez, A., Kahn, C. R., and Benito, M. (2009). Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes* 58, 820-828.

Fain, J. N., Cheema, P. S., Bahouth, S. W., and Lloyd Hiler, M. (2003). Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 674-678.

Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., and Bahouth, S. W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-2282.

## Bibliografia

Fang, W., Hartmann, N., Chow, D. T., Riegel, A. T., and Wellstein, A. (1992). Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J Biol Chem* 267, 25889-25897.

Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A., Di Mario, U., and Perfetti, R. (2002). Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology* 143, 4397-4408.

Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S. A., Perna, F., Fontana, S., *et al.* (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110, 1093-1103.

Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J., and Paschke, R. (2003). Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 1045-1050.

Faust, I. M., Johnson, P. R., Stern, J. S., and Hirsch, J. (1978). Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol* 235, E279-286.

Feng Han, Q., Zhao, W., Bentel, J., Shearwood, A. M., Zeps, N., Joseph, D., Iacopetta, B., and Dharmarajan, A. (2006). Expression of sFRP-4 and beta-catenin in human colorectal carcinoma. *Cancer Lett* 231, 129-137.

Fernandez-Real, J. M., and Ricart, W. (2003). Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 24, 278-301.

Field, A. E., Coakley, E. H., Must, A., Spadano, J. L., Laird, N., Dietz, W. H., Rimm, E., and Colditz, G. A. (2001). Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med* 161, 1581-1586.

Finegood, D. T., Scaglia, L., and Bonner-Weir, S. (1995). Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44, 249-256.

Finegood, D. T., Weir, G. C., and Bonner-Weir, S. (1999). Prior streptozotocin treatment does not inhibit pancreas regeneration after 90% pancreatectomy in rats. *Am J Physiol* 276, E822-827.

Fowlkes, J. L., and Serra, D. (1996). A rapid, non-radioactive method for the detection of insulin-like growth factor binding proteins by Western ligand blotting. *Endocrinology* 137, 5751-5754.

Fowlkes, J. L., Suzuki, K., Nagase, H., and Thrailkill, K. M. (1994). Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy: a role for matrix metalloproteinases. *Endocrinology* 135, 2810-2813.

Frayn, K. N. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45, 1201-1210.

- Frederich, R. C., Lollmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B. B., Lowell, B. B., and Flier, J. S. (1995). Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest* 96, 1658-1663.
- Freemark, M., Avril, I., Fleenor, D., Driscoll, P., Petro, A., Opara, E., Kendall, W., Oden, J., Bridges, S., Binart, N., *et al.* (2002). Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology* 143, 1378-1385.
- Friedrichsen, B. N., Galsgaard, E. D., Nielsen, J. H., and Moldrup, A. (2001). Growth hormone- and prolactin-induced proliferation of insulinoma cells, INS-1, depends on activation of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5). *Mol Endocrinol* 15, 136-148.
- Friedrichsen, B. N., Neubauer, N., Lee, Y. C., Gram, V. K., Blume, N., Petersen, J. S., Nielsen, J. H., and Moldrup, A. (2006). Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *J Endocrinol* 188, 481-492.
- Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., *et al.* (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307, 426-430.
- Gallagher, D., Heymsfield, S. B., Heo, M., Jebb, S. A., Murgatroyd, P. R., and Sakamoto, Y. (2000). Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 72, 694-701.
- Garofalo, C., and Surmacz, E. (2006). Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 207, 12-22.
- Garruti, G., and Ricquier, D. (1992). Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16, 383-390.
- Gasa, R. (2005). Transcriptional control of pancreatic endocrine cell development. *Drug News Perspect* 18, 567-576.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M., and Irizarry, R. A. (2004). affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20, 307-315.
- Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Graham, D., Kim, J. K., Shulman, G. I., Castle, A. L., Vinson, C., Eckhaus, M., and Reitman, M. L. (2000). Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 105, 271-278.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5, R80.
- George, M., Ayuso, E., Casellas, A., Costa, C., Devedjian, J. C., and Bosch, F. (2002). Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *J Clin Invest* 109, 1153-1163.

## Bibliografia

Georgia, S., and Bhushan, A. (2004). Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest* 114, 963-968.

Gerich, J. E. (2003). Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 78, 447-456.

Gleason, C. E., Gross, D. N., and Birnbaum, M. J. (2007). When the usual insulin is just not enough. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8681-8682.

Gosteli-Peter, M. A., Winterhalter, K. H., Schmid, C., Froesch, E. R., and Zapf, J. (1994). Expression and regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-I and growth hormone. *Endocrinology* 135, 2558-2567.

Gotoh, M., Maki, T., Satomi, S., Porter, J., Bonner-Weir, S., O'Hara, C. J., and Monaco, A. P. (1987). Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* 43, 725-730.

Graham, T. E., Yang, Q., Bluher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wason, C. J., Oberbach, A., Jansson, P. A., Smith, U., and Kahn, B. B. (2006). Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354, 2552-2563.

Grant, S. F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadottir, A., *et al.* (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38, 320-323.

Guler, H. P., Zapf, J., Schmid, C., and Froesch, E. R. (1989). Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121, 753-758.

Haffner, S. M., Howard, G., Mayer, E., Bergman, R. N., Savage, P. J., Rewers, M., Mykkanen, L., Karter, A. J., Hamman, R., and Saad, M. F. (1997). Insulin sensitivity and acute insulin response in African-Americans, non-Hispanic whites, and Hispanics with NIDDM: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 46, 63-69.

Haider, D. G., Schindler, K., Prager, G., Bohdjalian, A., Luger, A., Wolzt, M., and Ludvik, B. (2007). Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1168-1171.

Han, T. S., Seidell, J. C., Currall, J. E., Morrison, C. E., Deurenberg, P., and Lean, M. E. (1997). The influences of height and age on waist circumference as an index of adiposity in adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21, 83-89.

Haque, T., Nakada, S., and Hamdy, R. C. (2007). A review of FGF18: Its expression, signaling pathways and possible functions during embryogenesis and post-natal development. *Histol Histopathol* 22, 97-105.

- Hashimoto, N., Kido, Y., Uchida, T., Asahara, S., Shigeyama, Y., Matsuda, T., Takeda, A., Tsuchihashi, D., Nishizawa, A., Ogawa, W., *et al.* (2006). Ablation of PDK1 in pancreatic beta cells induces diabetes as a result of loss of beta cell mass. *Nat Genet* 38, 589-593.
- Hausman, D. B., DiGirolamo, M., Bartness, T. J., Hausman, G. J., and Martin, R. J. (2001). The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2, 239-254.
- Hayashi, T., Iwamoto, Y., Kaku, K., Hirose, H., and Maeda, S. (2007). Replication study for the association of TCF7L2 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetologia* 50, 980-984.
- Haynes, W. G., Morgan, D. A., Walsh, S. A., Mark, A. L., and Sivitz, W. I. (1997). Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 100, 270-278.
- Heit, J. J., Karnik, S. K., and Kim, S. K. (2006). Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 311-338.
- Hennige, A. M., Burks, D. J., Ozcan, U., Kulkarni, R. N., Ye, J., Park, S., Schubert, M., Fisher, T. L., Dow, M. A., Leshan, R., *et al.* (2003). Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J Clin Invest* 112, 1521-1532.
- Hill, D. J., Hogg, J., Petrik, J., Arany, E., and Han, V. K. (1999). Cellular distribution and ontogeny of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding protein messenger RNAs and peptides in developing rat pancreas. *J Endocrinol* 160, 305-317.
- Hill, J. O., and Peters, J. C. (1998). Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 280, 1371-1374.
- Hino, J., Kangawa, K., Matsuo, H., Nohno, T., and Nishimatsu, S. (2004). Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions. *Front Biosci* 9, 1520-1529.
- Hockings, P. D., Changani, K. K., Saeed, N., Reid, D. G., Birmingham, J., O'Brien, P., Osborne, J., Toseland, C. N., and Buckingham, R. E. (2003). Rapid reversal of hepatic steatosis, and reduction of muscle triglyceride, by rosiglitazone: MRI/S studies in Zucker fatty rats. *Diabetes Obes Metab* 5, 234-243.
- Hogg, J., Han, V. K., Clemmons, D. R., and Hill, D. J. (1993). Interactions of nutrients, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *J Endocrinol* 138, 401-412.
- Hogg, J., Hill, D. J., and Han, V. K. (1994). The ontogeny of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein gene expression in the rat pancreas. *J Mol Endocrinol* 13, 49-58.
- Holly, J. (2004). Physiology of the IGF system. *Novartis Found Symp* 262, 19-26; discussion 26-35, 265-268.

## Bibliografia

Hong, J., Zhang, G., Dong, F., and Rechler, M. M. (2002). Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277, 10489-10497.

Hossenlopp, P., Seurin, D., Segovia-Quinson, B., and Binoux, M. (1986). Identification of an insulin-like growth factor-binding protein in human cerebrospinal fluid with a selective affinity for IGF-II. *FEBS Lett* 208, 439-444.

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.

Hovey, R. C., MacKenzie, D. D., and McFadden, T. B. (1998). The proliferation of mouse mammary epithelial cells in response to specific mitogens is modulated by the mammary fat pad in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34, 385-392.

Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B. M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271, 10697-10703.

Hu, M. C., Qiu, W. R., Wang, Y. P., Hill, D., Ring, B. D., Scully, S., Bolon, B., DeRose, M., Luethy, R., Simonet, W. S., *et al.* (1998). FGF-18, a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation. *Mol Cell Biol* 18, 6063-6074.

Hugl, S. R., White, M. F., and Rhodes, C. J. (1998). Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem* 273, 17771-17779.

Hui, H., Wright, C., and Perfetti, R. (2001). Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50, 785-796.

IDF (2006). International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas 3th edition.

IDF (2009). International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas 4th edition.

Iguchi, H., Urashima, Y., Inagaki, Y., Ikeda, Y., Okamura, M., Tanaka, T., Uchida, A., Yamamoto, T. T., Kodama, T., and Sakai, J. (2007). SOX6 suppresses cyclin D1 promoter activity by interacting with beta-catenin and histone deacetylase 1, and its down-regulation induces pancreatic beta-cell proliferation. *J Biol Chem* 282, 19052-19061.

Ihaka, R., and Gentleman, R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Language Journal of Computational and Graphical Statistics* 3, 299-314.

Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B., and Speed, T. P. (2003a). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31, e15.

- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., and Speed, T. P. (2003b). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.
- Islam, M. S., Morton, N. M., Hansson, A., and Emilsson, V. (1997). Rat insulinoma-derived pancreatic beta-cells express a functional leptin receptor that mediates a proliferative response. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 851-855.
- Janssen, I., Heymsfield, S. B., Allison, D. B., Kotler, D. P., and Ross, R. (2002). Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal subcutaneous, and visceral fat. *Am J Clin Nutr* 75, 683-688.
- Jellema, A., Plat, J., and Mensink, R. P. (2004). Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur J Clin Invest* 34, 766-773.
- Jetton, T. L., Lausier, J., LaRock, K., Trotman, W. E., Larmie, B., Habibovic, A., Peshavaria, M., and Leahy, J. L. (2005). Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. *Diabetes* 54, 2294-2304.
- Jhala, U. S., Canettieri, G., Srean, R. A., Kulkarni, R. N., Krajewski, S., Reed, J., Walker, J., Lin, X., White, M., and Montminy, M. (2003). cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* 17, 1575-1580.
- Johnson, P. R., Stern, J. S., Greenwood, M. R., and Hirsch, J. (1978). Adipose tissue hyperplasia and hyperinsulinemia on Zucker obese female rats: a developmental study. *Metabolism* 27, 1941-1954.
- Johnson, P. R., Zucker, L. M., Cruce, J. A., and Hirsch, J. (1971). Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res* 12, 706-714.
- Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C. F., Tilg, H., and Patsch, J. R. (2003). Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 286-290.
- Kassem, S. A., Ariel, I., Thornton, P. S., Scheimberg, I., and Glaser, B. (2000). Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 49, 1325-1333.
- Kaung, H. L. (1994). Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn* 200, 163-175.
- Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627-2634.
- Kershaw, E. E., and Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-2556.



## Bibliografia

Kieffer, T. J., and Habener, J. F. (2000). The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E1-E14.

Kim, B. M., Han, Y. M., Shin, Y. J., Min, B. H., and Park, I. S. (2001). Clusterin expression during regeneration of pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 44, 2192-2202.

Kim, J. K., Gavrilova, O., Chen, Y., Reitman, M. L., and Shulman, G. I. (2000). Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem* 275, 8456-8460.

Kim, S. Y., Lee, S., Min, B. H., and Park, I. S. (2007). Functional association of the morphogenic factors with the clusterin for the pancreatic beta-cell differentiation. *Diabetes Res Clin Pract* 77 Suppl 1, S122-126.

Kinlaw, W. B., and Marsh, B. (2004). Adiponectin and HIV-lipodystrophy: taking HAART. *Endocrinology* 145, 484-486.

Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M., and Heitz, P. U. (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 4, 110-125.

Koiter, T. R., Wijkstra, S., van Der Schaaf-Verdonk, C. J., Moes, H., and Schuiling, G. A. (1995). Pancreatic beta-cell function and islet-cell proliferation: effect of hyperinsulinaemia. *Physiol Behav* 57, 717-721.

Koyama, M., Wada, R., Sakuraba, H., Mizukami, H., and Yagihashi, S. (1998). Accelerated loss of islet beta cells in sucrose-fed Goto-Kakizaki rats, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Pathol* 153, 537-545.

Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., *et al.* (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277, 25863-25866.

Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., Tsubamoto, Y., Komeda, K., Nakano, R., Miki, H., *et al.* (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49, 1880-1889.

Kulkarni, R. N., Bruning, J. C., Winnay, J. N., Postic, C., Magnuson, M. A., and Kahn, C. R. (1999). Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96, 329-339.

Kulkarni, R. N., Holzenberger, M., Shih, D. Q., Ozcan, U., Stoffel, M., Magnuson, M. A., and Kahn, C. R. (2002). beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet* 31, 111-115.

Kwon, G., Xu, G., Marshall, C. A., and McDaniel, M. L. (1999). Tumor necrosis factor alpha-induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and aminoguanidine. A role for

peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation and inos expression. *J Biol Chem* 274, 18702-18708.

Lafontan, M., and Berlan, M. (2003). Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* 24, 276-283.

Lau, D. C., Roncari, D. A., and Hollenberg, C. H. (1987). Release of mitogenic factors by cultured preadipocytes from massively obese human subjects. *J Clin Invest* 79, 632-636.

Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J. L., and Butler, A. (2001a). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22, 53-74.

Le Roith, D., Scavo, L., and Butler, A. (2001b). What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol Metab* 12, 48-52.

Leahy, J. L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 36, 197-209.

Levine, J. F., and Stockdale, F. E. (1984). 3T3-L1 adipocytes promote the growth of mammary epithelium. *Exp Cell Res* 151, 112-122.

Lewitt, M. S., Saunders, H., and Baxter, R. C. (1993). Bioavailability of insulin-like growth factors (IGFs) in rats determined by the molecular distribution of human IGF-binding protein-3. *Endocrinology* 133, 1797-1802.

Li, C., and Wong, W. H. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 31-36.

Li, Y. M., Schacher, D. H., Liu, Q., Arkins, S., Rebeiz, N., McCusker, R. H., Jr., Dantzer, R., and Kelley, K. W. (1997). Regulation of myeloid growth and differentiation by the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinology* 138, 362-368.

Li, Y. S., Milner, P. G., Chauhan, A. K., Watson, M. A., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Milbrandt, J., and Deuel, T. F. (1990). Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* 250, 1690-1694.

Lillioja, S., Mott, D. M., Howard, B. V., Bennett, P. H., Yki-Jarvinen, H., Freymond, D., Nyomba, B. L., Zurlo, F., Swinburn, B., and Bogardus, C. (1988). Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *N Engl J Med* 318, 1217-1225.

Lillioja, S., Mott, D. M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J. E., Ravussin, E., Knowler, W. C., Bennett, P. H., and Bogardus, C. (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 329, 1988-1992.

Lim, L., Spencer, S. A., McKay, P., and Waters, M. J. (1990). Regulation of growth hormone (GH) bioactivity by a recombinant human GH-binding protein. *Endocrinology* 127, 1287-1291.

## Bibliografia

- Ling, Z., Wu, D., Zambre, Y., Flamez, D., Drucker, D. J., Pipeleers, D. G., and Schuit, F. C. (2001). Glucagon-like peptide 1 receptor signaling influences topography of islet cells in mice. *Virchows Arch* 438, 382-387.
- Lingohr, M. K., Briaud, I., Dickson, L. M., McCuaig, J. F., Alarcon, C., Wicksteed, B. L., and Rhodes, C. J. (2006). Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem* 281, 15884-15892.
- Lingohr, M. K., Dickson, L. M., McCuaig, J. F., Hugl, S. R., Twardzik, D. R., and Rhodes, C. J. (2002). Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF- $\alpha$  or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 51, 966-976.
- Liu, J. L., Coschigano, K. T., Robertson, K., Lipsett, M., Guo, Y., Kopchick, J. J., Kumar, U., and Liu, Y. L. (2004). Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E405-413.
- Liu, W. M., Mei, R., Di, X., Ryder, T. B., Hubbell, E., Dee, S., Webster, T. A., Harrington, C. A., Ho, M. H., Baid, J., and Smeekens, S. P. (2002). Analysis of high density expression microarrays with signed-rank call algorithms. *Bioinformatics* 18, 1593-1599.
- Liu, Z., and Habener, J. F. (2008). Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation. *J Biol Chem* 283, 8723-8735.
- Llado, I., Estrany, M. E., Rodriguez, E., Amengual, B., Roca, P., and Palou, A. (2000). Effects of cafeteria diet feeding on beta3-adrenoceptor expression and lipolytic activity in white adipose tissue of male and female rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 1396-1404.
- Logan, C. Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Longo, K. A., Kennell, J. A., Ochocinska, M. J., Ross, S. E., Wright, W. S., and MacDougald, O. A. (2002). Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. *J Biol Chem* 277, 38239-38244.
- Longo, K. A., Wright, W. S., Kang, S., Gerin, I., Chiang, S. H., Lucas, P. C., Opp, M. R., and MacDougald, O. A. (2004). Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem* 279, 35503-35509.
- Lopez, I. P., Marti, A., Milagro, F. I., Zulet Md Mde, L., Moreno-Aliaga, M. J., Martinez, J. A., and De Miguel, C. (2003). DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res* 11, 188-194.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

- Lu, Y., Herrera, P. L., Guo, Y., Sun, D., Tang, Z., LeRoith, D., and Liu, J. L. (2004). Pancreatic-specific inactivation of IGF-I gene causes enlarged pancreatic islets and significant resistance to diabetes. *Diabetes* 53, 3131-3141.
- MacDougald, O. A., and Lane, M. D. (1995). Adipocyte differentiation. When precursors are also regulators. *Curr Biol* 5, 618-621.
- Madden, S. L., Galella, E. A., Riley, D., Bertelsen, A. H., and Beaudry, G. A. (1996). Induction of cell growth regulatory genes by p53. *Cancer Res* 56, 5384-5390.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221, 286-289.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., *et al.* (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8, 731-737.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., and *et al.* (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1, 1155-1161.
- Mannor, D. A., Winer, L. M., Shaw, M. A., and Baumann, G. (1991). Plasma growth hormone (GH)-binding proteins: effect on GH binding to receptors and GH action. *J Clin Endocrinol Metab* 73, 30-34.
- Margareto, J., Marti, A., and Martinez, J. A. (2001). Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPARgamma. *J Nutr Biochem* 12, 130-137.
- Marques, B. G., Hausman, D. B., and Martin, R. J. (1998). Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol* 275, R1898-1908.
- Martin, B. C., Warram, J. H., Krolewski, A. S., Bergman, R. N., Soeldner, J. S., and Kahn, C. R. (1992). Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340, 925-929.
- Matveyenko, A. V., Gurlo, T., Daval, M., Butler, A. E., and Butler, P. C. (2009). Successful versus failed adaptation to high-fat diet-induced insulin resistance: the role of IAPP-induced beta-cell endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* 58, 906-916.
- Mauer, M. M., and Bartness, T. J. (1997). Short-day-like body weight changes do not prevent fat pad compensation after lipectomy in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 272, R68-77.
- Mauer, M. M., Harris, R. B., and Bartness, T. J. (2001). The regulation of total body fat: lessons learned from lipectomy studies. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 15-28.

## *Bibliografia*

- McEvoy, R. C. (1981). Changes in the volumes of the A-, B-, and D-cell populations in the pancreatic islets during the postnatal development of the rat. *Diabetes* 30, 813-817.
- McEvoy, R. C., and Hegre, O. D. (1979). Syngeneic transplantation of fetal rat pancreas. III. Effect of insulin treatment on the growth and differentiation of the pancreatic implants after reversal of diabetes. *Diabetes* 28, 141-146.
- McEvoy, R. C., and Madson, K. L. (1980). Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. II. Changes in hormone content and concentration. *Biol Neonate* 38, 255-259.
- Meier, J. J., Butler, A. E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., Rizza, R. A., and Butler, P. C. (2008). Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes*.
- Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B., and Maechler, P. (2004). Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 145, 667-678.
- Min, B. H., Kim, B. M., Lee, S. H., Kang, S. W., Bendayan, M., and Park, I. S. (2003). Clusterin expression in the early process of pancreas regeneration in the pancreatectomized rat. *J Histochem Cytochem* 51, 1355-1365.
- Mokdad, A. H., Bowman, B. A., Ford, E. S., Vinicor, F., Marks, J. S., and Koplan, J. P. (2001). The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *Jama* 286, 1195-1200.
- Moldrup, A., Petersen, E. D., and Nielsen, J. H. (1993). Effects of sex and pregnancy hormones on growth hormone and prolactin receptor gene expression in insulin-producing cells. *Endocrinology* 133, 1165-1172.
- Montague, C. T., and O'Rahilly, S. (2000). The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49, 883-888.
- Montanya, E., Nacher, V., Biarnes, M., and Soler, J. (2000). Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49, 1341-1346.
- Moore, G. B., Chapman, H., Holder, J. C., Lister, C. A., Piercy, V., Smith, S. A., and Clapham, J. C. (2001). Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 735-741.
- Movassat, J., Saulnier, C., and Portha, B. (1997). Insulin administration enhances growth of the beta-cell mass in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetes* 46, 1445-1452.
- Munzberg, H., and Myers, M. G., Jr. (2005). Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8, 566-570.

Muoio, D. M., and Lynis Dohm, G. (2002). Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16, 653-666.

Nadler, S. T., and Attie, A. D. (2001). Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J Nutr* 131, 2078-2081.

Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N. H., Mazda, T., and Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 120, 803-812.

Nandi, A., Kitamura, Y., Kahn, C. R., and Accili, D. (2004). Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 84, 623-647.

Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14, 353-362.

Ni, Z., Anini, Y., Fang, X., Mills, G., Brubaker, P. L., and Jin, T. (2003). Transcriptional activation of the proglucagon gene by lithium and beta-catenin in intestinal endocrine L cells. *J Biol Chem* 278, 1380-1387.

Nielsen, F. C. (1992). The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res* 4, 257-290.

Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G. (1999). Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng* 12, 3-9.

Ning, Y., Schuller, A. G., Bradshaw, S., Rotwein, P., Ludwig, T., Frystyk, J., and Pintar, J. E. (2006). Diminished growth and enhanced glucose metabolism in triple knockout mice containing mutations of insulin-like growth factor binding protein-3, -4, and -5. *Mol Endocrinol* 20, 2173-2186.

Okada, T., Liew, C. W., Hu, J., Hinault, C., Michael, M. D., Krtzfeldt, J., Yin, C., Holzenberger, M., Stoffel, M., and Kulkarni, R. N. (2007). Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8977-8982.

Okamoto, H., Hribal, M. L., Lin, H. V., Bennett, W. R., Ward, A., and Accili, D. (2006). Role of the forkhead protein FoxO1 in beta cell compensation to insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 775-782.

Oki, K., Yamane, K., Kamei, N., Nojima, H., and Kohno, N. (2007). Circulating visfatin level is correlated with inflammation, but not with insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67, 796-800.

Olsen, T. S. (1978). Lipomatosis of the pancreas in autopsy material and its relation to age and overweight. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 86A, 367-373.

## Bibliografia

Orci, L., Baetens, D., Ravazzola, M., Stefan, Y., and Malaisse-Lagae, F. (1976). Pancreatic polypeptide islets and glucagon islets: distinct topographic distribution in rat pancreas. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 283, 1213-1216.

Orci, L., and Unger, R. H. (1975). Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet* 2, 1243-1244.

Pagano, C., Pilon, C., Olivieri, M., Mason, P., Fabris, R., Serra, R., Milan, G., Rossato, M., Federspil, G., and Vettor, R. (2006). Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3165-3170.

Papadopoulou, S., and Edlund, H. (2005). Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function. *Diabetes* 54, 2844-2851.

Paris, M., Bernard-Kargar, C., Berthault, M. F., Bouwens, L., and Ktorza, A. (2003). Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology* 144, 2717-2727.

Parker, L. H., Schmidt, M., Jin, S. W., Gray, A. M., Beis, D., Pham, T., Frantz, G., Palmieri, S., Hillan, K., Stainier, D. Y., *et al.* (2004). The endothelial-cell-derived secreted factor *Egfl7* regulates vascular tube formation. *Nature* 428, 754-758.

Parsons, J. A., Bartke, A., and Sorenson, R. L. (1995). Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* 136, 2013-2021.

Parsons, J. A., Brelje, T. C., and Sorenson, R. L. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130, 1459-1466.

Parsons, J. A., Hartfel, M. A., Hegre, O. D., and McEvoy, R. C. (1983). Effect of MtTW15 mammosomatotropic tumors on pancreatic islet hormones. *Diabetes* 32, 67-74.

Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., Macphee, C. H., and Smith, S. A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 472-476.

Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540-543.

Perez-Pinera, P., Berenson, J. R., and Deuel, T. F. (2008). Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 15, 210-214.

Peter, M. A., Winterhalter, K. H., Boni-Schnetzler, M., Froesch, E. R., and Zapf, J. (1993). Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue. *Endocrinology* 133, 2624-2631.

- Petrik, J., Pell, J. M., Arany, E., McDonald, T. J., Dean, W. L., Reik, W., and Hill, D. J. (1999). Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia. *Endocrinology* 140, 2353-2363.
- Pick, A., Clark, J., Kubstrup, C., Levisetti, M., Pugh, W., Bonner-Weir, S., and Polonsky, K. S. (1998). Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47, 358-364.
- Pinnick, K. E., Collins, S. C., Londos, C., Gauguier, D., Clark, A., and Fielding, B. A. (2008). Pancreatic ectopic fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition. *Obesity (Silver Spring)* 16, 522-530.
- Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B., and Sussel, L. (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2924-2929.
- Prats, E., Monfar, M., Castella, J., Iglesias, R., and Alemany, M. (1989). Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol Behav* 45, 263-272.
- Prentki, M., and Nolan, C. J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116, 1802-1812.
- Pucci, S., Bonanno, E., Pichiorri, F., Angeloni, C., and Spagnoli, L. G. (2004). Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* 23, 2298-2304.
- RDevelopmentCoreTeam (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rea, R., and Donnelly, R. (2004). Resistin: an adipocyte-derived hormone. Has it a role in diabetes and obesity? *Diabetes Obes Metab* 6, 163-170.
- Redondo, M., Villar, E., Torres-Munoz, J., Tellez, T., Morell, M., and Petito, C. K. (2000). Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 157, 393-399.
- Redonnet, A., Groubet, R., Noel-Suberville, C., Bonilla, S., Martinez, A., and Higuieret, P. (2001). Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. *Metabolism* 50, 1161-1167.
- Reitman, M. L., Mason, M. M., Moitra, J., Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Eckhaus, M., and Vinson, C. (1999). Transgenic mice lacking white fat: models for understanding human lipotrophic diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 892, 289-296.
- Revollo, J. R., Korner, A., Mills, K. F., Satoh, A., Wang, T., Garten, A., Dasgupta, B., Sasaki, Y., Wolberger, C., Townsend, R. R., *et al.* (2007). Namp1/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab* 6, 363-375.



## Bibliografia

Rhodes, C. J. (2000). IGF-I and GH post-receptor signaling mechanisms for pancreatic beta-cell replication. *J Mol Endocrinol* 24, 303-311.

Robbins, D. C., Danforth, E., Jr., Horton, E. S., Burse, R. L., Goldman, R. F., and Sims, E. A. (1979). The effect of diet on thermogenesis in acquired lipodystrophy. *Metabolism* 28, 908-916.

Robbins, D. C., Horton, E. S., Tulp, O., and Sims, E. A. (1982). Familial partial lipodystrophy: complications of obesity in the non-obese? *Metabolism* 31, 445-452.

Roden, M., Price, T. B., Perseghin, G., Petersen, K. F., Rothman, D. L., Cline, G. W., and Shulman, G. I. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97, 2859-2865.

Roden, M., Stingl, H., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Hofer, A., Landau, B. R., Nowotny, P., Waldhausl, W., and Shulman, G. I. (2000). Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* 49, 701-707.

Rongvaux, A., Shea, R. J., Mulks, M. H., Gigot, D., Urbain, J., Leo, O., and Andris, F. (2002). Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol* 32, 3225-3234.

Ross, S. E., Erickson, R. L., Gerin, I., DeRose, P. M., Bajnok, L., Longo, K. A., Misek, D. E., Kuick, R., Hanash, S. M., Atkins, K. B., *et al.* (2002). Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol* 22, 5989-5999.

Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., and MacDougald, O. A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-953.

Ruan, H., Miles, P. D., Ladd, C. M., Ross, K., Golub, T. R., Olefsky, J. M., and Lodish, H. F. (2002). Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 51, 3176-3188.

Rulifson, I. C., Karnik, S. K., Heiser, P. W., ten Berge, D., Chen, H., Gu, X., Taketo, M. M., Nusse, R., Hebrok, M., and Kim, S. K. (2007). Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6247-6252.

Ryysy, L., Hakkinen, A. M., Goto, T., Vehkavaara, S., Westerbacka, J., Halavaara, J., and Yki-Jarvinen, H. (2000). Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49, 749-758.

Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S., and McNiece, I. (1994). Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 14, 1431-1437.

Sandler, S., Bendtzen, K., Eizirik, D. L., and Welsh, M. (1990). Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 126, 1288-1294.

Scaglia, L., Cahill, C. J., Finegood, D. T., and Bonner-Weir, S. (1997). Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138, 1736-1741.

Scaglia, L., Smith, F. E., and Bonner-Weir, S. (1995). Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 136, 5461-5468.

Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270, 26746-26749.

Schinner, S., Ulgen, F., Papewalis, C., Schott, M., Woelk, A., Vidal-Puig, A., and Scherbaum, W. A. (2008). Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules. *Diabetologia* 51, 147-154.

Schinner, S., Willenberg, H. S., Schott, M., and Scherbaum, W. A. (2009). Pathophysiological aspects of Wnt-signaling in endocrine disease. *Eur J Endocrinol* 160, 731-737.

Schmidt, M. H., Bicker, F., Nikolic, I., Meister, J., Babuke, T., Picuric, S., Muller-Esterl, W., Plate, K. H., and Dikic, I. (2009). Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) modulates Notch signalling and affects neural stem cell renewal. *Nat Cell Biol* 11, 873-880.

Schuppin, G. T., Bonner-Weir, S., Montana, E., Kaiser, N., and Weir, G. C. (1993). Replication of adult pancreatic-beta cells cultured on bovine corneal endothelial cell extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A, 339-344.

Scrocchi, L. A., Brown, T. J., McClusky, N., Brubaker, P. L., Auerbach, A. B., Joyner, A. L., and Drucker, D. J. (1996). Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med* 2, 1254-1258.

Scrocchi, L. A., Hill, M. E., Saleh, J., Perkins, B., and Drucker, D. J. (2000). Elimination of glucagon-like peptide 1R signaling does not modify weight gain and islet adaptation in mice with combined disruption of leptin and GLP-1 action. *Diabetes* 49, 1552-1560.

Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G., Furlanetto, R. W., and Mooney, R. A. (2003). Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 278, 13740-13746.

Seppala-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Hakkinen, A. M., Goto, T., Westerbacka, J., Sovijarvi, A., Halavaara, J., and Yki-Jarvinen, H. (2002). Fat accumulation in the liver is

## Bibliografia

associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3023-3028.

Seymour, P. A., Bennett, W. R., and Slack, J. M. (2004). Fission of pancreatic islets during postnatal growth of the mouse. *J Anat* 204, 103-116.

Shannan, B., Seifert, M., Leskov, K., Willis, J., Boothman, D., Tilgen, W., and Reichrath, J. (2006). Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 13, 12-19.

Shappell, N. W., Lazo, R. O., and Asch, B. B. (1991). Comparative growth of normal and malignant mouse mammary epithelium cultured serum-free on a biomatrix from preadipocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A, 569-577.

Shim, M. L., Levitt Katz, L. E., Davis, J., Dotzler, W. C., Cohen, P., and Ferry, R. J., Jr. (2004). Insulin-like growth factor binding protein-3 is a novel mediator of apoptosis in insulin-secreting cells. *Growth Horm IGF Res* 14, 216-225.

Shimomura, I., Hammer, R. E., Ikemoto, S., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401, 73-76.

Sieradzki, J., Fleck, H., Chatterjee, A. K., and Schatz, H. (1988). Stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on [3H]thymidine incorporation, DNA content and insulin biosynthesis and secretion of isolated pancreatic rat islets. *J Endocrinol* 117, 59-62.

Silha, J. V., Gui, Y., and Murphy, L. J. (2002). Impaired glucose homeostasis in insulin-like growth factor-binding protein-3-transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E937-945.

Silos-Santiago, I., Yeh, H. J., Gurrieri, M. A., Guillerman, R. P., Li, Y. S., Wolf, J., Snider, W., and Deuel, T. F. (1996). Localization of pleiotrophin and its mRNA in subpopulations of neurons and their corresponding axonal tracts suggests important roles in neural-glia interactions during development and in maturity. *J Neurobiol* 31, 283-296.

Sjogren, K., Liu, J. L., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Tornell, J., Isaksson, O. G., Jansson, J. O., and Ohlsson, C. (1999). Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7088-7092.

Skau, M., Pakkenberg, B., Buschard, K., and Bock, T. (2001). Linear correlation between the total islet mass and the volume-weighted mean islet volume. *Diabetes* 50, 1763-1770.

Sone, H., and Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* 48, 58-67.

Steinberg, J., Oyasu, R., Lang, S., Sintich, S., Rademaker, A., Lee, C., Kozlowski, J. M., and Sensibar, J. A. (1997). Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1707-1711.

Stephens, L. A., Thomas, H. E., Ming, L., Grell, M., Darwiche, R., Volodin, L., and Kay, T. W. (1999). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology* 140, 3219-3227.

Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., and Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.

Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijenberg, M. P., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 31, 141-149.

Swenne, I. (1982). The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells. *Diabetes* 31, 754-760.

Swenne, I., and Eriksson, U. (1982). Diabetes in pregnancy: islet cell proliferation in the fetal rat pancreas. *Diabetologia* 23, 525-528.

Takaoka, M., Nagata, D., Kihara, S., Shimomura, I., Kimura, Y., Tabata, Y., Saito, Y., Nagai, R., and Sata, M. (2009). Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. *Circ Res* 105, 906-911.

Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., and *et al.* (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182-186.

Tanabe, K., Okuya, S., Tanizawa, Y., Matsutani, A., and Oka, Y. (1997). Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 765-768.

Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., *et al.* (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117, 246-257.

Teta, M., Rankin, M. M., Long, S. Y., Stein, G. M., and Kushner, J. A. (2007). Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* 12, 817-826.

Tourel, C., Bailbe, D., Meile, M. J., Kergoat, M., and Portha, B. (2001). Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes* 50, 1562-1570.

Trujillo, M. E., Sullivan, S., Harten, I., Schneider, S. H., Greenberg, A. S., and Fried, S. K. (2004). Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5577-5582.

## Bibliografia

Tschen, S. I., Dhawan, S., Gurlo, T., and Bhushan, A. (2009). Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes* 58, 1312-1320.

Tsiotra, P. C., Tsigos, C., and Raptis, S. A. (2001). TNFalpha and leptin inhibit basal and glucose-stimulated insulin secretion and gene transcription in the HIT-T15 pancreatic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25, 1018-1026.

Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-5121.

Tuttle, R. L., Gill, N. S., Pugh, W., Lee, J. P., Koeberlein, B., Furth, E. E., Polonsky, K. S., Najj, A., and Birnbaum, M. J. (2001). Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med* 7, 1133-1137.

Tyrberg, B., Eizirik, D. L., Hellerstrom, C., Pipeleers, D. G., and Andersson, A. (1996). Human pancreatic beta-cell deoxyribonucleic acid-synthesis in islet grafts decreases with increasing organ donor age but increases in response to glucose stimulation in vitro. *Endocrinology* 137, 5694-5699.

Tyrberg, B., Ustinov, J., Otonkoski, T., and Andersson, A. (2001). Stimulated endocrine cell proliferation and differentiation in transplanted human pancreatic islets: effects of the ob gene and compensatory growth of the implantation organ. *Diabetes* 50, 301-307.

Ueki, K., Okada, T., Hu, J., Liew, C. W., Assmann, A., Dahlgren, G. M., Peters, J. L., Shackman, J. G., Zhang, M., Artner, I., *et al.* (2006). Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta cells causes overt diabetes. *Nat Genet* 38, 583-588.

Ulgen, F., Scherbaum, W. A., Partke, H. J., Bornstein, S. R., and Schinner, S. (2008). Intrapancreatic adipocyte deposition in a mouse model of the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 40, 507-509.

Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., and Hotamisligil, G. S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389, 610-614.

Valentinis, B., Bhala, A., DeAngelis, T., Baserga, R., and Cohen, P. (1995). The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. *Mol Endocrinol* 9, 361-367.

Van Assche, F. A., Gepts, W., and Aerts, L. (1980). Immunocytochemical study of the endocrine pancreas in the rat during normal pregnancy and during experimental diabetic pregnancy. *Diabetologia* 18, 487-491.

Vasavada, R. C., Garcia-Ocana, A., Zawalich, W. S., Sorenson, R. L., Dann, P., Syed, M., Ogren, L., Talamantes, F., and Stewart, A. F. (2000). Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia. *J Biol Chem* 275, 15399-15406.

- Vasavada, R. C., Gonzalez-Pertusa, J. A., Fujinaka, Y., Fiaschi-Taesch, N., Cozar-Castellano, I., and Garcia-Ocana, A. (2006). Growth factors and beta cell replication. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 931-950.
- Ventre, J., Doebber, T., Wu, M., MacNaul, K., Stevens, K., Pasparakis, M., Kollias, G., and Moller, D. E. (1997). Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 46, 1526-1531.
- Wabitsch, M., Heinze, E., Debatin, K. M., and Blum, W. F. (2000). IGF-I- and IGFBP-3-expression in cultured human preadipocytes and adipocytes. *Horm Metab Res* 32, 555-559.
- Walden, P. D., Ruan, W., Feldman, M., and Kleinberg, D. L. (1998). Evidence that the mammary fat pad mediates the action of growth hormone in mammary gland development. *Endocrinology* 139, 659-662.
- Wang, R. N., Kloppel, G., and Bouwens, L. (1995). Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38, 1405-1411.
- Way, J. M., Gorgun, C. Z., Tong, Q., Uysal, K. T., Brown, K. K., Harrington, W. W., Oliver, W. R., Jr., Willson, T. M., Kliever, S. A., and Hotamisligil, G. S. (2001). Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 276, 25651-25653.
- Weir, G. C., and Bonner-Weir, S. (2007). A dominant role for glucose in beta cell compensation of insulin resistance. *J Clin Invest* 117, 81-83.
- Welters, H. J., and Kulkarni, R. N. (2008). Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 19, 349-355.
- Werner, H., Weinstein, D., and Bentov, I. (2008). Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch Physiol Biochem* 114, 17-22.
- Wierup, N., Yang, S., McEvelly, R. J., Mulder, H., and Sundler, F. (2004). Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* 52, 301-310.
- Wilson, C. L., and Miller, C. J. (2005). Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis. *Bioinformatics* 21, 3683-3685.
- Winzell, M. S., Nogueiras, R., Dieguez, C., and Ahren, B. (2004). Dual action of adiponectin on insulin secretion in insulin-resistant mice. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 154-160.
- Xiao, Y. T., Xiang, L. X., and Shao, J. Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 550-553.

## Bibliografia

- Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F., and Bonner-Weir, S. (1999). Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48, 2270-2276.
- Xu, X., D'Hoker, J., Stange, G., Bonne, S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Casteele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D., *et al.* (2008). Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132, 197-207.
- Xuan, S., Kitamura, T., Nakae, J., Politi, K., Kido, Y., Fisher, P. E., Morroni, M., Cinti, S., White, M. F., Herrera, P. L., *et al.* (2002). Defective insulin secretion in pancreatic beta cells lacking type 1 IGF receptor. *J Clin Invest* 110, 1011-1019.
- Yakar, S., Liu, J. L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., and LeRoith, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7324-7329.
- Yakar, S., Rosen, C. J., Beamer, W. G., Ackert-Bicknell, C. L., Wu, Y., Liu, J. L., Ooi, G. T., Setser, J., Frystyk, J., Boisclair, Y. R., and LeRoith, D. (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110, 771-781.
- Yamada, P. M., and Lee, K. W. (2009). Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C954-976.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., *et al.* (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., *et al.* (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-946.
- Yang, Q., Graham, T. E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O. D., Zabolotny, J. M., Kotani, K., Quadro, L., and Kahn, B. B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436, 356-362.
- Yang, Q., Yamagata, K., Fukui, K., Cao, Y., Nammo, T., Iwahashi, H., Wang, H., Matsumura, I., Hanafusa, T., Bucala, R., *et al.* (2002). Hepatocyte nuclear factor-1alpha modulates pancreatic beta-cell growth by regulating the expression of insulin-like growth factor-1 in INS-1 cells. *Diabetes* 51, 1785-1792.
- Yi, F., Brubaker, P. L., and Jin, T. (2005). TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* 280, 1457-1464.
- You, H., and Laychock, S. G. (2009). Atrial natriuretic peptide promotes pancreatic islet beta-cell growth and Akt/Foxo1a/cyclin D2 signaling. *Endocrinology* 150, 5455-5465.

Zhang, N., Yeh, H. J., Zhong, R., Li, Y. S., and Deuel, T. F. (1999). A dominant-negative pleiotrophin mutant introduced by homologous recombination leads to germ-cell apoptosis in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6734-6738.

Zhang, N., Zhong, R., Wang, Z. Y., and Deuel, T. F. (1997). Human breast cancer growth inhibited in vivo by a dominant negative pleiotrophin mutant. *J Biol Chem* 272, 16733-16736.

Zhang, S., and Kim, K. H. (1995). TNF-alpha inhibits glucose-induced insulin secretion in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *FEBS Lett* 377, 237-239.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zhou, J., Pineyro, M. A., Wang, X., Doyle, M. E., and Egan, J. M. (2002). Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3beta transcription factors. *J Cell Physiol* 192, 304-314.

Zhou, J., Wang, X., Pineyro, M. A., and Egan, J. M. (1999). Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes* 48, 2358-2366.

Zimmet, P., Alberti, K. G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.





## VIII. ANNEX



**Llista de gens diferencialment expressats en teixit adipós pMES entre rates control i de cafeteria, obtinguts en l'anàlisi dels microarrays.**

Probe set	Gene Symbol	Gene Title	Representative Public ID	FC
1398276_at	<i>Dlg2</i>	discs, large homolog 2 (Drosophila)	NM_022282	4,75
1371076_at	<i>Cyp2b1</i> /// <i>Cyp2b15</i> /// <i>Cyp2b2</i> /// LOC685222 /// LOC687222	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 1 /// cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 15 /// cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 2 /// similar to Cytochrome P450 2B12 (CYP11B12) /// similar to Cytochrome P450 2B12 (CYP11B12)	A1454613	3,99
1371293_at	LOC688228	similar to Myosin light polypeptide 4 (Myosin light chain 1, atrial isoform)	A1103218	3,86
1386936_at	<i>Griffin</i>	galactin-related inter-fiber protein	NM_057187	3,55
1367660_at	<i>Fabp3</i>	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	NM_024162	3,25
1387958_at	<i>Akr1c18</i>	aldo-keto reductase family 1, member C18	L32601	3,2
1387748_at	<i>Lep</i>	leptin	NM_013076	3,01
1371895_at	<i>Krt14</i>	keratin 14	BI279646	2,98
1370026_at	<i>Cryab</i>	crystallin, alpha B	NM_012935	2,71
1370568_at	<i>Adra2c</i>	adrenergic receptor, alpha 2c	M58316	2,5
1390421_at	<i>RGD1310475</i>	Similar to RIKEN cDNA 0610010D20	A1232524	2,39
1375303_at	<i>Ldb3</i>	LIM domain binding 3	BI294983	2,27
1384147_at	<i>Eif1a</i>	eukaryotic translation initiation factor 1A	AA955540	2,24
1387985_a_at	<i>Obp3</i>	alpha-2u globulin PGCL4	AB039825	2,23
1368618_at	<i>Grb14</i>	growth factor receptor bound protein 14	NM_031623	2,2
1373436_at	<i>RGD1306739</i>	similar to RIKEN cDNA 1700040L02	A1171288	2,19
1383624_at	<i>RGD1565033</i>	similar to hypothetical protein LOC284018 isoform b	BF420279	2,15
1370106_at	<i>Fgf18</i>	fibroblast growth factor 18	NM_019199	2,09
1377163_at	<i>Inhbb</i>	Inhibin beta-B	BM385741	2,05

1389809_at	<i>Pmepa1</i>	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	AI410144	1,97
1369680_at	<i>Slc2a13</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13	NM_133611	1,96
1388689_at	<i>LOC682245</i>	similar to Acylphosphatase, muscle type isozyme (Acylphosphate phosphohydrolase)	AI170755	1,92
1368109_at	<i>St3gal5</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	NM_031337	1,92
1376799_a_at	<i>Crif1</i>	cytokine receptor-like factor 1	AA925924	1,88
1392265_s_at	<i>Mmp23</i>	matrix metalloproteinase 23	AI548892	1,88
1367908_at	<i>Gcsh</i>	glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)	NM_133598	1,87
1384367_at	<i>RGD1563516</i>	similar to histone protein Hist2h3c1	AI715140	1,86
1382265_at	<i>Gcap14</i>	granule cell antiserum positive 14	AI070061	1,85
1389783_s_at	<i>RGD1311906</i>	similar to Fc fragment of IgG binding protein; IgG Fc binding protein	BI280865	1,85
1373960_at	<i>Tmem120a</i>	transmembrane protein 120A	AI235631	1,83
1367734_at	<i>Akr1b1</i>	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	NM_012498	1,83
1372485_at	<i>Pcbd1</i>	pterin 4 alpha carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 1	BF281220	1,78
1381012_at	<i>Serpinf1</i>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1	BI303349	1,77
1393621_at	<i>Vkorc111</i>	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1-like 1	AA956405	1,77
1373674_at	<i>Mfap5</i>	microfibrillar associated protein 5	BI283094	1,75
1395146_at	<i>Adipor2</i>	adiponectin receptor 2	BI290608	1,75
1369674_at	<i>P2rx5</i>	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	X92069	1,74
1376500_at	<i>Fbxo23</i>	F-box only protein 23	AI639044	1,74
1376977_at	<i>Ptger3</i>	Prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	AI411541	1,73
1398612_at	<i>Akr1c12</i>	aldo-keto reductase family 1, member C12	BM383010	1,71
1373590_at	<i>Stom</i>	stomatin	BI295949	1,7
1373657_at	<i>Slc31a2</i>	solute carrier family 31, member 2	BF417391	1,7
1380956_at	<i>LOC367597</i>	Similar to nidogen 2	BG672418	1,69

1371883_at	<i>Mmd</i>	monocyte to macrophage differentiation-associated	BG376037	1,67
1375971_at	<i>Cln5</i>	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5	BM386028	1,65
1368394_at	<i>Sfrp4</i>	secreted frizzled-related protein 4	AF140346	1,64
1372476_at	<i>Fads3</i>	fatty acid desaturase 3	AW533321	1,64
1368095_at	<i>Ak3</i>	adenylate kinase 3	NM_013218	1,64
1392856_at	<i>Serf1</i>	small EDRK-rich factor 1	AI549470	1,62
1395519_at	<i>MGC95152</i>	similar to B230212L03Rik protein	BG670960	1,62
1398262_at	<i>Prps2</i>	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	NM_012634	1,61
1368387_at	<i>Bdh1</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	NM_053995	1,61
1370361_at	<i>Cgref1</i>	cell growth regulator with EF hand domain 1	U66470	1,61
1382376_at	<i>Bag4</i>	BCL2-associated athanogene 4	BI297220	1,6
1392563_at	<i>Prr5</i>	proline rich 5 (renal)	AW252517	1,59
1369336_at	<i>Hr</i>	hairless	NM_024364	1,59
1368486_at	<i>Irs3</i>	insulin receptor substrate 3	NM_032074	1,59
1369581_at	<i>Pemt</i>	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	NM_013003	1,59
1393191_at	<i>RGD1561205</i>	similar to RIKEN cDNA 2610200G18	BF554733	1,57
1374635_at	<i>LOC689663</i>	Hypothetical protein LOC689663	AW527151	1,56
1373803_a_at	<i>Ghr</i>	growth hormone receptor	AI170771	1,54
1395765_at	<i>RGD1307396</i>	similar to RIKEN cDNA 6330406I15	BF546899	1,54
1388463_at	<i>Tex264</i>	testis expressed gene 264	AW252660	1,54
1373620_at	<i>Nus1</i>	nuclear undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	AI102038	1,53
1368165_at	<i>Prps1</i>	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	NM_017243	1,53
1374582_at	<i>Kctd9</i>	potassium channel tetramerisation domain containing 9	AI175423	1,52
1374947_at	<i>Bcar3</i>	breast cancer anti-estrogen resistance 3	BI286041	1,52

1387271_at	<i>Phyh</i>		phytanoyl-CoA hydroxylase	NM_053674	1,5
1377205_at	<i>RGD1308759</i>		similar to KIAA0892 protein	BE107410	-1,51
1368851_at	<i>Ets1</i>		v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	NM_012555	-1,51
1374626_at	<i>Lrg1</i>		leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	BG371585	-1,51
1391456_at	<i>Jam3</i>		junctional adhesion molecule 3	AA998207	-1,51
1391430_at	<i>Cyb5r2</i>		cytochrome b5 reductase 2	BE105855	-1,51
1368297_at	<i>Gata2</i>		GATA binding protein 2	NM_033442	-1,52
1369083_at	<i>Cirbp</i>		cold inducible RNA binding protein	NM_031147	-1,52
1377159_at	<i>Tsc22d4</i>		TSC22 domain family, member 4	BE120729	-1,52
1389351_at	<i>Lrrfp1</i>		leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	BM387864	-1,54
1398354_at	<i>Ctnna1</i>		catenin (cadherin associated protein), alpha-like 1	AI555457	-1,54
1388940_at	<i>Arhgap25</i>		Rho GTPase activating protein 25	AW252115	-1,54
1368073_at	<i>Irf1</i>		interferon regulatory factor 1	NM_012591	-1,54
1391925_at	<i>Ccl19</i>		chemokine (C-C motif) ligand 19	AA996885	-1,54
1372691_at	<i>Upp1</i>		uridine phosphorylase 1	BI292558	-1,56
1393460_at	<i>Lrrc33</i>		leucine rich repeat containing 33	BM388665	-1,56
1370097_a_at	<i>Cxcr4</i>		chemokine (C-X-C motif) receptor 4	U54791	-1,56
1394022_at	<i>Id4</i>		inhibitor of DNA binding 4	BE116009	-1,56
1370402_at	<i>Egfl7</i>		EGF-like domain 7	AF223678	-1,57
1369968_at	<i>Ptn</i>		pleiotrophin	NM_017066	-1,58
1370905_at	<i>Dock9</i>		dedicator of cytokinesis 9	BI291229	-1,58
1384939_at	<i>Il18r1</i>		interleukin 18 receptor 1	BF522954	-1,61
1386956_at	<i>Scarb1</i>		scavenger receptor class B, member 1	NM_031541	-1,61
1368227_at	<i>Slc28a2</i>		solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	NM_031664	-1,62

1387547_a_at	<i>Eltf1</i>		EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1	NM_022294	-1,63
1397439_at	<i>LOC497978</i>		similar to diacylglycerol kinase epsilon	AI101639	-1,66
1379703_at	<i>Dennd3</i>		DENN/MADD domain containing 3	BF288207	-1,66
1367784_a_at	<i>Clu</i>		clusterin	AF314657	-1,67
1370383_s_at	<i>RT1-Db1</i>		RT1 class II, locus Db1	BI279526	-1,67
1396163_at	<i>Igtp</i>		interferon gamma induced GTPase	BF563316	-1,67
1386080_at	<i>Hey1</i>		Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	BE107815	-1,67
1370987_at	<i>Spn</i>		sialophorin	BF550890	-1,68
1392990_at	<i>Sox17</i>		SRY-box containing gene 17	AI031004	-1,7
1369146_a_at	<i>Ahr</i>		aryl hydrocarbon receptor	AF082125	-1,7
1390114_at	<i>Mpz11</i>		myelin protein zero-like 1	BM384017	-1,71
1380668_at	<i>MGC72974</i>		Hypothetical LOC316976	BI275851	-1,72
1382778_at	<i>Dusp6</i>		Dual specificity phosphatase 6	AI231350	-1,72
1392259_at	<i>Hectd1</i>		HECT domain containing 1	AI574925	-1,73
1368512_a_at	<i>Enpep</i>		glutamyl aminopeptidase	AF214568	-1,76
1383075_at	<i>Ccnd1</i>		cyclin D1	BI295861	-1,77
1368514_at	<i>Maob</i>		monoamine oxidase B	NM_013198	-1,83
1383679_at	<i>Rnf31</i>		ring finger protein 31	BF411972	-1,84
1369720_at	<i>Myo1b</i>		myosin Ib	NM_053986	-1,85
1373992_at	<i>MGC108823</i>		similar to interferon-inducible GTPase	AI408440	-1,91
1383938_at	<i>Ncoa7</i>		nuclear receptor coactivator 7	BI286738	-1,92
1369625_at	<i>Aqp1</i>		aquaporin 1	AA891661	-1,92
1368911_at	<i>Kcnj8</i>		potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	AB043636	-1,93
1389092_at	<i>Il2rg</i>		interleukin 2 receptor, gamma chain	AI178808	-1,99



1387189_at	<i>Slc22a3</i>		solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 3	NM_019230	-2,04
1394681_at	<i>Akr1c1</i>		aldo-keto reductase family 1, member C-like 1	AW522526	-2,13
1369691_at	<i>Scn3a</i>		sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	NM_013119	-2,22
1380063_at	<i>Ch25h</i>		cholesterol 25-hydroxylase	AI169398	-2,43
1367786_at	<i>Psmb8</i>		proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	NM_080767	-2,43
1369664_at	<i>Avpr1a</i>		arginine vasopressin receptor 1A	NM_053019	-2,5
1367652_at	<i>Igfbp3</i>		insulin-like growth factor binding protein 3	AI1713966	-2,59
1368459_at	<i>Gdf10</i>		growth differentiation factor 10	NM_024375	-2,62
1370822_at	<i>RT1-Ba</i>		RT1 class II, locus Ba	AF307302	-2,64
1387073_at	<i>Snap25</i>		synaptosomal-associated protein 25	NM_030991	-2,74
1387134_at	<i>Slfm3</i>		schlafen 3	NM_053687	-2,75
1387053_at	<i>Fmo1</i>		flavin containing monooxygenase 1	NM_012792	-2,89
1368420_at	<i>Cp</i>		ceruloplasmin	NM_012532	-2,94
1393347_at	<i>Itgal</i>		integrin alpha L	BI289767	-3,03
1385682_at	<i>Vit</i>		vitron	BI300559	-3,14
1387157_at	<i>Pmfbp1</i>		polyamine modulated factor 1 binding protein 1	NM_134393	-3,2
1370429_at	<i>RT1-Aw2</i>		RT1 class Ib, locus Aw2	L40362	-3,24
1387319_at	<i>Ccl11</i>		chemokine (C-C motif) ligand 11	NM_019205	-3,96
1368610_at	<i>Mca32</i>		mast cell antigen 32	NM_021585	-4,21
1389734_x_at	<i>RT1-149</i>		RT1-149 protein	BI282965	-5,5
1371262_at	<i>IgG-2a</i> /// <i>Igha_mapped</i> /// <i>LOC678701</i>		gamma-2a immunoglobulin heavy chain /// immunoglobulin heavy chain (alpha polypeptide) (mapped) /// hypothetical protein LOC678701	AJ391299	-6,15
1371065_at	<i>LOC688090</i> /// <i>RT1-Bb</i>		similar to RT1 class II histocompatibility antigen, B-1 beta chain precursor (RT1.B-beta(1)) /// RT1 class II, locus Bb	BM389513	-17,49

**IX. PUBLICACIONES  
ORIGINADES  
DURANT LA TESI**



## **COMUNICACIONES EN CONGRESSOS**

TIPUS DE PARTICIPACIÓ: Presentació oral

AUTORS: N. Palau, R. Gomis, A. Barberá

TÍTOL: "Estudio de la biocomunicación entre el tejido adiposo y célula beta"

CONGRÉS: Reunión Grupo Islotes de la sociedad Española de Diabetes. Barcelona, 2007.

TIPUS DE PARTICIPACIÓ: Presentació oral

AUTORS: A. Barberá, N. Palau, J. Altirriba, S. Piquer, R. Gomis

TÍTOL: "Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) secreted by visceral adipose tissue mediates beta-cell mass compensation in obesity"

CONGRÉS: 1st International Brussels pancreatic Islet Symposium. Brussels, 2007.

TIPUS DE PARTICIPACIÓ: Presentació oral

AUTORS: N. Palau, J. Altirriba, S. Piquer, R. Gomis, A. Barberá

TÍTOL: "IGFBP3 secreted by visceral adipose tissue mediates beta-cell mass compensation in obesity"

CONGRÉS: 43rd annual meeting of the European Association for the study of Diabetes. Amsterdam, 2007

TIPUS DE PARTICIPACIÓ: Presentació oral

AUTORS: N. Palau, J. Altirriba, S. Piquer, R. Gomis, A. Barberá

TÍTOL: "IGFBP3 participa en la regulación de la masa de célula  $\beta$  en la obesidad"

CONGRÉS: Reunión Anual de Redimet. Cardona, 2007

TIPUS DE PARTICIPACIÓ: Presentació oral

AUTORS: N. Palau, J. Altirriba, S. Piquer, R. Gomis, A. Barberá

TÍTOL: "IGFBP3 participa en la regulación de la masa de célula  $\beta$  en la obesidad"

CONGRÉS: XIX Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Sevilla, 2008.

## **ARTICLES**

AUTORS (p.o. de firma): Nuria Palau\*, Sandra A. Rebuffat\*, Jordi Altirriba, Sandra Piquer, Felicia Hanzu, Ramon Gomis†, Albert Barberà‡.

TÍTOL: "Role of Igfbp3 in the regulation of beta cell mass during obesity: an adipose tissue – beta cell cross talk"

REVISTA: Article sotmès a la revista Endocrinology (actualment en revisió)



1 **Role of Igfbp3 in the regulation of beta cell mass during obesity: an adipose tissue – beta**  
2 **cell cross talk**

3 Abbreviated title: IGFBP3 effects on beta cell replication

4 **Nuria Palau\***, **Sandra A. Rebuffat\***, **Jordi Altirriba**, **Sandra Piquer**, **Felicia Hanzu**,  
5 **Ramon Gomis†**, **Albert Barbera†**

6 Diabetes and Obesity Laboratory (N.P., S.A.R., J.A., S.P., F.H., R.G., A.B.), Endocrinology and  
7 Nutrition Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic  
8 de Barcelona; Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas  
9 Asociadas (S.A.R., J.A., S.P., F.H., R.G), E-08036 Barcelona, Spain

10 \* N.P. and S.A.R. are co-authors of this paper

11 † R.G. and A.B. contributed equally to this study

12 Address all correspondence and requests for reprints to:

13 Albert Barbera, PhD

14 IDIBAPS

15 Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain

16 Telephone: +34 932274180 Fax: +34 932279240 E-mail: [abarbera@clinic.ub.es](mailto:abarbera@clinic.ub.es)

17 Key words: Obesity, beta cell replication, IGFBP3, beta cell plasticity, adipocyte, islet

18 Word count:

19 Number of figures: 8

20 Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

21 **Precis:** The adipose tissue surrounding the pancreas is able to regulate beta cell mass in response to an  
22 increase in insulin demand.

23 This work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) SAF  
24 2006/07382, from European Union UE-PEOPLE-2007-3-1-IAPP and from Generalitat de Catalunya  
25 (Spain) SGR2009/1426. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades  
26 metabólicas is an initiative of Instituto de Salud Carlos III N.P. was a recipient of a grant from Fondo  
27 de Investigaciones Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III, Spain).

28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

**Abstract**

In obesity, an increase in beta cell mass occurs in order to cope with the raise in insulin demand. This beta cell plasticity is essential to avoid the onset of hyperglycemia; however the molecular mechanisms that regulate this process still remain unclear. This study analyzed the role of the adipose tissue in the control of beta cell replication. Using a diet-induced model of obesity, we obtained conditioned media from three different white adipose tissue depots. Only in the adipose tissue depot surrounding the pancreas, the diet induced changes that lead to an increase in INS1E and islet replication rate. In order to identify the factors responsible for this proliferative effect, adipose tissue gene expression analysis was conducted by microarrays and qRT-PCR. From all the differentially expressed proteins, only the secreted ones were studied. Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) was identified as the candidate of this effect. Furthermore, while the blockage of IGFBP3 in the conditioned media leads to an increase in the proliferation rate; the addition of the protein decreased this rate. Taken together, these data show that obesity induces specific changes in the adipokine secretion profile of the adipose tissue depot surrounding the pancreas leading to a decrease in IGFBP3 expression. This decrease acts in a paracrine manner stimulating beta cell proliferation rate. This cross talk between the visceral-pancreatic adipose tissue and beta cell is a novel mechanism that controls beta cell plasticity.

Abbreviations: pMES, pancreatic mesenteric depot; iSUB, inguinal subcutaneous depot; eWAT epididymal depot; CM, conditioned medium; IGFBP3, insulin-like growth factor binding protein 3

55 **Introduction**

56 Under normal conditions, beta cells can increase enough their insulin secretion to respond to  
57 organisms demands, and in obesity, overcome the increase in insulin demands. This ability is partially  
58 due to an expansion in pancreatic beta cell mass (1, 2). The capacity of beta cell mass to increase is a  
59 key factor in the pathogenesis of type 2 diabetes. When this response is efficient enough, the  
60 hyperglycemia can be avoided; this is the case of approximately two thirds of obese subjects (3).  
61 However in the remaining one third, type 2 diabetes finally appears because beta cell mass is not  
62 appropriate to cope with the development of insulin resistance. Indeed, it has been demonstrated that  
63 beta cell mass in type 2 diabetic patients, not only does not expand but also is reduced about 50% of  
64 normal (4).

65 This beta cell mass compensatory response can be accomplished through beta cell replication,  
66 beta cell hypertrophy, or formation of new islets through neogenesis (5) The dominant mechanism in  
67 humans remains unclear, but in adult rodents, appears to be beta cell replication (6-8). The molecular  
68 mechanisms that control the obesity-induced beta cell mass increase are not completely understood,  
69 however, important advances have been done in this field. It has been shown that IRS-2/PI3K/AKT  
70 signaling pathway is critical for beta cell survival and growth. However, the extracellular signals that  
71 participate in this compensatory mechanism are less clear. Glucose metabolism seems to has a critical  
72 role (9), but a basal IRS-2/PI3K/AKT activation is also an essential requirement. Although most  
73 evidences point out that insulin is the activator for IRS-2/PI3K/AKT pathway (10-13), IGF-1 could  
74 also exert a compensatory role when the insulin signal is not functional (14).

75 Adipose tissue has always been considered to be an energy store with few interesting  
76 attributes. Nevertheless, nowadays it has been clearly shown that adipocytes integrate a wide array of  
77 physiological processes (15). All of them are coordinated mainly through the synthesis and release of  
78 adipokines, which can act either locally or through the blood stream (16). It is worth stating that  
79 several of the adipokines secreted by the adipocyte have proliferative properties. This capacity is  
80 higher in obese patients and significantly correlates with the size of the adipocyte (17).



81           Taking into account the key role of the adipose tissue as an endocrine organ, and the  
82 proliferate capacity of some of its secreted adipokines, it is reasonable to hypothesize that they could  
83 participate in the obesity-induced beta cell mass expansion. The aim of this study was to evaluate the  
84 feasibility of this role and to identify the signals involved in this beta cell mass adaptation. Using a  
85 diet-induced obese model, we have shown that the adipose tissue surrounding the pancreas is able to  
86 secrete proliferative signals which are partially responsible for the adaptation of beta cell mass  
87 observed in obesity.

## 88 **Materials and Methods**

### 89 **Animals**

90 Adult male Wistar rats (Charles River, Wilmington, MA, USA), 7 weeks old (weighing 225–  
91 250 g), were caged individually in a 12-h light, 12-h dark cycle in a temperature- and humidity-  
92 controlled environment. Animals were divided into two dietary sets for 30 or 60 days. One group was  
93 fed with standard chow diet (supplying 8% of calories as fat; type AO4 from Panlab, Barcelona,  
94 Spain). The second group was fed with a cafeteria diet as previously described (18). The animals were  
95 allowed to eat and drink ad libitum. During the experiment period, the body weight was measured  
96 every 5 days. At the end of the experiment, rats from each group were anesthetized and killed by  
97 decapitation. For morphological studies, pancreases were removed, weighed and fixed in 10%  
98 buffered formalin. Adipose tissue from different depots: the inguinal subcutaneous (iSUB), the  
99 epididymal (eWAT) and the mesenteric surrounding the pancreas (pMES) was excised, weighed, cut  
100 and either used for the conditioned medium preparation or rapidly frozen in liquid nitrogen for RNA  
101 isolation. All animal procedures were approved by the Animal Research Committee of the University  
102 of Barcelona.

103

### 104 **Metabolic parameters and intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT)**

105 Animals were fasted 5 h before metabolic measurements or IGTT. Blood glucose was  
106 measured using an automatic glucose monitoring device. Plasma insulin levels were measured by  
107 ELISA kits from Mercodia (Uppsala, Sweden). IGTT was performed by the administration of an  
108 intraperitoneal injection of D-glucose (2 g/kg body weight), blood samples were collected from the tail  
109 vein at time 0 (before injection), 15, 30, 60, and 120 min after glucose or insulin injection. Insulin and  
110 glucose levels were measured as previously described.

111

### 112 **Islet morphology studies**

113 The pancreases fixed in formalin were embedded in paraffin and serial sections were cut  
114 (4µm) from three different levels for each pancreas block. For beta cell mass and replication studies,

115 paraffin sections were stained for insulin or Ki67 (Dako, Glostrup, Denmark) respectively, using the  
116 indirect peroxidase technique. In these sections, toluidine blue dye was used for islet counterstaining.  
117 Individual beta cell area was measured in sections immunofluorescently stained for insulin (Dako) and  
118 co-stained with propidium iodide to detect the nuclei. The cross-sectional areas were measured with  
119 Leica DRM software (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

120

### 121 **Conditioned medium (CM)**

122 The CM was prepared as previously described (17), with some modification. Adipose tissue  
123 from three different adipose depots (iSUB, eWAT and pMES) was removed, weighed and finely  
124 minced in PBS. Under sterile conditions, the tissue aliquots were filtered through nylon gauze (70 µm  
125 mesh, Cell Strainer, BD Biosciences, Bedford, MA, USA), washed in PBS and cultured for 4h in  
126 RPMI1640 (Biosera, Ringmer, UK) containing 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2  
127 mmol/L L-glutamine, 11.1mmol/L D-Glucose and 0.2% BSA. The ratio of tissue-to-medium was  
128 adjusted at 1 g of tissue to 5 ml of medium. The conditioned medium was subsequently collected,  
129 carefully avoiding the lipid floating on the top, filtered with a 0,22 µm sterile filter (Millipore,  
130 Bedford, MA, USA) and kept frozen at -80°C until usage.

131

### 132 **Proliferation assays**

133 INS-1E cells (kindly provided by Dr P. Maechler) were maintained as described elsewhere  
134 (19). Two days after seeding, the cells were cultured for 24 h in RPMI1640 containing 5.5 mmol/L  
135 glucose, 1mmol/L sodium pyruvate, 50 µmol/L 2-mercaptoethanol, 2 mmol/L glutamine, 10 mmol/L  
136 HEPES, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.1% BSA. The cells were then washed  
137 with PBS and cultured in medium containing an aliquot of CM for 20 hours (CM was diluted 1/3 in  
138 RPMI1640 and supplemented up to 1mmol/L sodium pyruvate, 50 µmol/L 2-mercaptoethanol, 2  
139 mol/L glutamine, 10 mmol/L HEPES, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1% BSA and  
140 either 5.5 mmol/L or 15 mmol/L glucose). After, [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine (370 kBq/ml) was added to

141 the media for 4 h. The media was removed; cells washed twice with cold PBS and were kept frozen  
142 until cell radiation was measured to assess cell proliferation (20).

143 Rat islets were obtained by collagenase digestion from 8-week-old control rats as (21) and  
144 islet proliferation was measured (22). Briefly, islets were cultured in groups of 50 in medium  
145 containing an aliquot of CM for 24 hours (CM was diluted 1/3 in RPMI1640 and supplemented up to 2  
146 mmol/L glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2% Fetal Bovine Serum (FBS)  
147 and 5.5 mmol/L glucose). Then, hydroxyurea (12.5 mmol/L) was added to the medium for another 24  
148 hours. Afterwards, islets were washed four times in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) and  
149 cultured in the same test medium for 3 h, after which [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine (370 kBq/ml) was added  
150 for 1 additional hour. Then, islets were counted, hand-picked, washed with HBSS three times,  
151 resuspended and sonicated at 10W. To quantify proliferation, islet radiation was measured in a Tri-  
152 carb 2300TR liquid scintillation analyzer (Perkin Elmer Packard, Waltham, MA, USA). The use of  
153 [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine for measuring islet proliferation has been validated in previous studies (23).

154 For inactivation experiments, CM was heated at 65°C for 10 minutes. Igfb3 antibody (Upstate,  
155 Temecula Ca, EEUU) and recombinant Igfbp3 protein (R&D systems, Minneapolis, EEUU) were  
156 added to the media at 0,001 or 0,1 µg/ml and 10 or 50 µmol/L respectively.

157

## 158 **RNA isolation**

159 Frozen adipose tissue was quickly weighed and total RNA extracted using the RNeasy  
160 MiniKit (Qiagen, Hilden, Germany) according the manufacturer's instructions (3 ml of Qiazol were  
161 used per 300 mg of tissue). RNA integrity was analyzed using a Lab-on-a-chip in a 2100 Bioanalyzer  
162 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

163

## 164 **Microarrays performance and analysis**

165 Ten µg of total RNA from pMES adipose tissue was converted into cRNA, biotinilated,  
166 fragmented and hybridized to GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA). Five  
167 microarrays were hybridized, three with independent samples coming from rats fed with standard

168 chow (lean group) and two with independent samples coming from rats fed with cafeteria diet (obese  
169 group). All our arrays passed the quality controls established by the manufacturer (Supplemental  
170 Methods). Additionally, they were also submitted to several powerful statistical applications in order  
171 to assess their quality, concluding that none of them could be considered an outlier (Supplemental  
172 Methods, Figures 1 and 2).

173 Background adjustment, normalization and data summarization of raw data were performed  
174 by Robust Multi-array Analysis (RMA) (24) using the Affy package (25). Statistical analysis was  
175 conducted with those genes that changed at least 1.5-fold between cafeteria and standard groups, were  
176 called Present (calculated with microarray suite 5 software from Affymetrix (26) in at least two arrays  
177 of one group, and were not Affymetrix internal control genes. Differential expression analysis was  
178 carried out with SAM (Significance Analysis of Microarrays) (27) controlling the false discovery rate  
179 (FDR) at 5%. Heat diagrams were generated using dChip software (28).

180

### 181 **Real Time PCR**

182 Total RNA was retrotranscribed with SuperscriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real  
183 Time PCR was carried out in a 7900 HT Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA,  
184 USA) using SYBR Green fluorophor. The primers used are described in Supplemental Table 1. A  
185 standard curve of each primer set was generated from serial dilutions of cDNA. Expression levels  
186 obtained were normalized with a housekeeping gene (TATA box binding protein).

187

### 188 **Stromal and adipocyte fractions separation**

189 1,5 g of adipose tissue from pMES, eWAT and iSUB depots were finely minced and digested  
190 in 5 ml of DMEM F12 (GibcoBRL, Gathersburg, MD, EEUU) containing 2 mg/ml collagenase  
191 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) and 2% BSA for 20 minutes, at 37°C, under constant shaking.  
192 After adding 5 ml of DMEM F12 containing 10% Newborn Calf Serum (NCS), the samples were  
193 filtered through a 25 µm nylon mesh to remove the undigested adipose tissue, and centrifuged at 1600

194 rpm for 10 minutes. Afterwards, both the floating mature adipocytes from the top, and the pellet  
195 containing stromal fraction were kept frozen at -80°C until usage.

196

### 197 **Protein extraction**

198 Frozen adipose tissue was homogenized in a buffer containing 50 mmol/L Tris pH 7.5, 150  
199 mmol/L NaCl, 1% Triton X100, 10 mmol/L sodium phosphate, 10 mmol/L sodium fluoride, 1 mmol/L  
200 sodium vanadate and protease inhibitors (Sigma cocktail, Sigma, St Louis, MO, EEUU) (400 µl of  
201 buffer were used per 200 ug of adipose tissue). After 30 minutes of incubation at 4°C, lysates were  
202 centrifuged at 14000 rpm for 30 minutes at 4°C, and supernatants were recovered and kept at -80°C.

203

### 204 **Western Blot**

205 Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes by standard  
206 protocols. The membranes, previously blocked 1h in TBS buffer containing 0,05% Tween-20 and 5%  
207 skimmed milk, were first incubated overnight at 4°C with anti-IGFBP3 antibody (1/1000, Upstate) or  
208 anti-actin antibody (1/500, Sigma-Aldrich). Then, after washing, an anti-rabbit peroxidase conjugate  
209 secondary antibody was added (1/5000, Amersham) for 1h at room temperature. The complex was  
210 visualized with enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB).  
211 Intensity values were obtained with Image Gauge 4.0 software (Fujifilm, Valhalla, NY, USA)

212

### 213 **Statistical analysis**

214 All results are expressed as mean  $\pm$  sem. Differences between the experimental groups were  
215 evaluated by the Student t test or by the nonparametric Mann-Whitney U test. P < 0.05 was considered  
216 significant.

## 217 **Results**

### 218 **Characterization of the cafeteria model**

219 Administration of a cafeteria diet induced a fast increase in the animals' body weight. The  
220 difference in body weight between lean and diet-induced obese rats was observed after 10 days of diet  
221 and raised gradually with time (Fig.1A). These results were similar to those obtained by our group and  
222 others using a similar diet (18, 29). After the diet-induced obesity period (30 and 60 days), animals  
223 were sacrificed, allowing a gravimetric analysis of different adipose tissues (Fig.1B). We measured  
224 three different white adipose tissue deposits: iSUB, eWAT and pMES. The cafeteria diet increased the  
225 weight of all the depots analyzed, this difference was already significant after 30 days of diet and it  
226 was even more notable after 60 days.

227 As expected, the obesity induced by the cafeteria diet led to an impairment of glucose  
228 tolerance. As shown in figure 2, during an IGTT, diet-induced obese rats showed higher levels of  
229 glycemia and insulinemia, which were unable to return to basal levels after two hours. Moreover,  
230 while no significant differences were observed in basal glycemia, diet-induced obese rats have higher  
231 fasted plasma levels of insulin and serum levels of nonesterified fatty acids (NEFA) compared to lean  
232 ones (Supplemental Methods and Figure 3).

233

### 234 **Diet-induced obese rats show higher beta cell replication rates**

235 In order to determine whether an increase in beta cell mass was responsible for the  
236 hyperinsulinemia observed in diet-induced obese rats; a morphological study of the pancreas was  
237 carried out. The percentage of insulin area relative to total pancreas is used as an indicator of beta cell  
238 mass (9,30). As shown in Fig.3A, the cafeteria diet induced a significant increase in the insulin area of  
239 the pancreas in diet-induced obese rats compared to lean ones, both after 30 days and 60 days of diet.  
240 Moreover, in diet-induced obese rats, a progressive increase in this parameter was observed with time.

241 Therefore, since a raise in beta cell mass was observed, we decided to study which were the  
242 mechanisms involved. Our results clearly state that this mass expansion was due both to an increase in  
243 the islets size (hyperplasia) and islets number (neogenesis) (Fig. 3B and C). On the one hand, although

244 the beta cell replication rate decreased with time in both dietary groups, the diet-induced obese rats  
245 always showed a higher beta cell replication rate compared to lean animals (Fig. 3D). This increase led  
246 to a rise in islet size after 30 and 60 days of cafeteria diet (Fig. 3B). On the other hand, after 60 days of  
247 diet, the number of islets per pancreas area was also elevated in diet-induced obese rats (Fig. 3C). In  
248 conclusion, all these mechanisms are involved in the increase of beta cell mass due to cafeteria diet.  
249 However, the contribution of beta cell replication seems to be the most important in this model.

250

### 251 **The conditioned medium of pMES adipose tissue induced beta cell proliferation**

252 To test whether the mass expansion of beta cell was mediated by any factor secreted by  
253 adipose tissue, an *in vitro* experiment was set up. Proliferation of a beta cell line, INS1E cells, was  
254 analyzed when cultured in the presence of CM obtained from different adipose tissue depots: eWAT,  
255 iSUB, and pMES. Only in the latest, we observed significant differences between the conditioned  
256 media from diet-induced obese and lean rats. A two times increase in INS1E proliferation rate was  
257 obtained in conditioned media prepared from pMES adipose tissues from rats after 30 and 60 days of  
258 cafeteria diet (Fig. 4A and B). These results suggest that only in the pMES depot, the cafeteria diet  
259 induces changes that lead to a new secretion pattern of adipokines with higher proliferative impact in  
260 beta cell.

261 Some growth factors such as IGF1 and GH are known to have an effect on beta cell  
262 proliferation in a glucose-dependent manner (31, 32). In order to unravel whether glucose also  
263 influences the proliferation induced by the conditioned medium from pMES, the INS1E proliferation  
264 experiments were performed at two different glucose concentrations (5.5 and 15mM). As shown in  
265 figure 4C, glucose alone showed a tendency to increase proliferation as concentration rise, being  
266 significant for conditioned media from diet-induced obese rats. However, the effect of the cafeteria-  
267 diet conditioned medium compared to control one was not potentiated by glucose since a two fold  
268 increase was observed at both low and high glucose concentration (Fig. 4C).

269 Afterwards, in order to determine whether the factor(s) secreted by pMES adipose tissue  
270 responsible for the higher proliferation rate was a protein, heat inactivation experiments of the CM



271 were carried out. The inactivation by heat of the CM completely abolished the observed effects on  
272 proliferation (Fig. 4D) that is no differences were observed in the INS1E replication rate between the  
273 two experimental groups. Therefore, the chemical nature of these factors is probably proteic.

274 Finally, the higher proliferative properties of pMES from diet-induced obese rats were also  
275 tested in control islets, using the same protocols as in INS1E cells. During 48h, islets were cultured  
276 with conditioned medium obtained from pMES of diet-induced obese and lean rats, and, similarly to  
277 what we observed in INS1E experiments, a higher proliferation rate was observed in the conditioned  
278 media from diet-induced obese rats compared to lean ones (Fig. 4E).

279

### 280 **Identification of the proliferative factors in pMES adipose tissue from diet-induced obese rats**

281 In order to identify the factor(s) secreted by the pMES adipose tissue from diet-induced obese  
282 rats which are able to increase the proliferation rate of pancreatic beta cells, a transcriptomic approach  
283 was carried out analyzing the pMES adipose tissue gene expression of the two experimental groups.  
284 The comparison of the gene expression levels between the two groups result in the identification of  
285 213 differentially expressed genes. On this total, 104 were induced and 109 repressed by cafeteria diet,  
286 the complete list of these genes is shown in Supplemental Table 2. Since the protein(s) responsible for  
287 the proliferative effects has to be secreted to the media in order to exert its functions, using the SignalP  
288 3.0 Server of the “ExPASy Proteomics Server” web (33), we selected from the complete list of  
289 differentially expressed genes, those whose protein was secreted (Fig. 5). From these genes, 15 were  
290 up-regulated and 11 down-regulated; and when plotted using a heat diagram, this was clearly able to  
291 differentiate between the diet-induced obese and lean groups (Fig. 5). After bibliographical research,  
292 from the above mentioned list (Supplemental Table 3), we selected the genes whose function could  
293 explain the proliferative effects on beta cell induced by the pMES adipose tissue from diet-induced  
294 obese rats (Fig. 5 last column).

295 The expression of these genes was verified using quantitative RT-PCR to check whether they  
296 behave similarly to what we observed in the arrays’ analysis. Moreover, the expression was also  
297 checked in eWAT adipose tissue. Since the proliferative effect was only observed in pMES

298 conditioned media, the candidate gene(s) has to only show significant differences in its expression  
299 levels in pMES and not in eWAT adipose tissue. Five of ten studied genes did not confirm the  
300 microarrays' results, meaning that no significant differences were observed in the pMES gene  
301 expression between diet-induced obese and lean rats (Fig. 6A-E). Another two genes: clusterin (*Clu*)  
302 and leptin (*Lep*) (Fig. 6F and G) showed differential pMES expression between diet-induced obese  
303 and lean groups, confirming the microarray data. However, similar pattern was observed in the eWAT  
304 adipose tissue expression, invalidating the possibility of being the candidate gene. The gene *Ghr*,  
305 another of the candidate genes, codes for three different growth hormone receptors which are obtained  
306 by differential splicing (34, 35): *Ghr*, growth hormone receptor; *Ghrtr*, a truncated version; and *Ghbp*,  
307 growth hormone binding protein. Therefore, we decided to analyze the three transcripts by quantitative  
308 RT-PCR (Fig 6H-J). Of these three transcripts, only *Ghbp*, a secreted protein, was of interest, while an  
309 increase in the expression of *Ghr* and *Ghrtr* transcripts was observed in the obese pMES; *Ghbp*  
310 expression did not show any difference between the diet-induced obese and lean rats. Therefore, *Ghbp*  
311 was not the candidate gene. Finally the expression of insulin-like growth factor binding protein  
312 (*Igfbp3*) and secreted frizzled-related protein 4 (*Sfrp4*) genes was analyzed, and similarly to what was  
313 observed in the microarray analysis, a decrease in *Igfbp3* and an increase in *Sfrp4* was detected (Fig.  
314 6K and L). These differences were only identified in pMES adipose tissue while no significant  
315 changes were observed in eWAT and also in iSUB adipose tissue. The latter was added to the analysis  
316 to further confirm the hypothesis of being the candidate genes.

317

### 318 **IGFBP3 mRNA and protein are decreased in cafeteria rats**

319 IGFBP3 is able to modulate the actions of IGF both in the circulation but also in the  
320 extracellular environment. Interestingly, IGFBP3 also exhibit biological effects independent to IGF  
321 pathway, such as inhibition of cell growth and/or promotion of apoptosis (36). For these reasons, we  
322 decided to further study the role of *Igfbp3* in the obesity-induced increased in beta cell replication. Our  
323 results demonstrated that, in diet-induced obese rats, a down regulation of *Igfbp3* expression is  
324 observed in pMES adipose tissue. Moreover, IGFBP3 protein is also decreased in the pMES adipose

325 tissue of diet-induced obese rats compared to lean ones (Fig. 7A), and no differences were observed in  
326 the eWAT depot (Fig. 7B). Thus, the effects on gene expression are correlated by changes in the  
327 protein levels.

328 Adipose tissue consists mainly of adipocytes and a stromal fraction, which contains among  
329 others preadipocytes, macrophages, stem cells; and plays a key role in the pathogenesis of obesity.  
330 Igfbp3 is mainly expressed in the stromal fraction (Supplemental Fig. 4). When we analyzed whether  
331 the decrease of Igfbp3 in diet-induced obese rats took place in both fractions, surprisingly Igfbp3 only  
332 decreased in the stromal fraction while no differences were found in the adipocyte fraction (Fig 7C).  
333 Furthermore, the analysis of Igf1 expression showed that Igf1, contrary to Igfbp3, is mainly expressed  
334 in the adipocyte fraction (Suppl. Fig. 4); and no significant differences were observed between diet-  
335 induced obese and lean animals, both in total adipose tissue and in the two fractions analyzed (Fig  
336 7D).

337

### 338 **Implication of IGFBP3 on beta cell proliferation**

339 Since IGFBP3 protein was decreased only in the pMES adipose tissue of diet-induced obese  
340 rats, we decided to confirm the role that this protein could play in the increase in beta cell replication.  
341 First, since IGFBP3 levels are decreased in the pMES conditioned media from diet-induced obese rats,  
342 IGFBP3 recombinant protein was added to the conditioned media obtained from these animals, and as  
343 expected, a decrease in the proliferation rate was observed (Fig. 8A). Surprisingly, a reduction was  
344 also observed in control media, probably due to the intrinsic anti-proliferative properties of IGFBP3.  
345 Finally, an antibody against IGFBP3, which blocks this protein effects, was added to the pMES  
346 conditioned medium from lean rats, trying to mimic the situation of the diet-induced obese rats. As  
347 shown in figure 8B, the blockage of IGFBP3 resulted in an increase in beta cell proliferation; whereas  
348 the addition of the antibody to control media did not have any action. This lack of effect was expected,  
349 since the control media has no Igfbp3 to block. Summing up, the data presented clearly show that  
350 decrease of Igfbp3 expression participates in the adaptation of beta cell mass to the higher insulin  
351 demands in obesity.

352 **Discussion**

353 Our data presented here indicate that a cross talk between adipose tissue and beta cell exist  
354 and helps the organism to adapt to the new physiological needs linked to the onset of obesity.  
355 However, this cross talk does not happen with any white adipose depot, only the adipose tissue that  
356 surrounds the pancreas changes, with obesity, in a way that the new adipokines secretion pattern is  
357 able to stimulate beta cell replication. Thus, this increase leads to a raise in beta cell mass which helps  
358 to cope with the insulin resistance.

359 It is worth stating that, similarly to our results, it has been shown that the proliferative  
360 properties of conditioned media from adipose tissue increase with obesity (17). This higher mitogenic  
361 capacity seems to respond to changes in the secretion profile induced by adipocyte hypertrophy (17).  
362 In line with this, we have also observed that the adipocytes size from the peri-pancreatic depot nearly  
363 doubled in the diet-induced obese animals compared to lean ones (Supplemental Methods and Fig. 5).  
364 The preadipocytes from the same depot are normally the main target for these proliferative actions.  
365 However, it has been suggested that these signals could act on other cell types, for example they are  
366 involved in the cardiovascular complications linked to obesity (37) or in the development of mammary  
367 gland cancer (38).

368 In a previous recent paper, it was shown that conditioned media from human adipocytes was  
369 able to increase Ins-1 proliferation (39), identifying WNTs factors as responsible for this effects.  
370 Interestingly, in our analysis, a member of the WNT signaling pathway was also found, sFRP4, as a  
371 putative candidate to mediate the obesity-induced increase in beta cell proliferation. Nevertheless, our  
372 results provide additional data in this interesting link between obesity and beta cell mass regulation.  
373 Not only did we identify new adipokines able to modulate beta cell proliferation, but we also  
374 demonstrate that these mitotic properties are induced by obesity only in a particular adipose depot, the  
375 pMES. These results, while surprising, may also be somewhat expected. On one hand, the specific role  
376 of pMES adipose tissue can be understood considering the well established heterogeneity that exists  
377 between the different adipose tissue depots (16). In fact, each adipose tissue displays a unique  
378 expression profile and a specific secretion pattern (40). On the other hand, it is also clear that obesity

379 can modify the function of adipocytes and their pattern of secretion (41). In particular, visceral adipose  
380 tissue depot, which pMES is part of it, has been linked to many diseases associated with obesity  
381 including type 2 diabetes (42-44). Therefore, obesity, probably through adipocyte hypertrophy, changes  
382 the adipokines profile in every adipose tissue depot, but only in the pMES, these changes are able to  
383 stimulate beta cell proliferation. Physiologically, it makes sense since these actions take place locally,  
384 in a paracrine way, and it is the adipose tissue that surrounds the pancreas the one who is more  
385 accessible to islets.

386 The search for the adipokines responsible for this pMES-mediated effect on beta cell  
387 replication led to the identification of two proteins: sFRP4 and IGFBP3. sFRP4 belongs to the  
388 secreted frizzled related proteins that modulate WNT signaling (45-47). Both sFRP4 and IGFBP3 are  
389 described mainly as inhibitors of proliferation (36, 45), and in our expression analysis, while sFRP4  
390 was up regulated in pMES adipose tissue from diet-induced obese rats; IGFBP3 was down regulated.  
391 Only this decrease of an antiproliferative factor in pMES tissue could explain the higher mitotic  
392 properties of its conditioned medium, which is why we finally considered IGFBP3 as the best  
393 candidate to explain the effects of conditioned media from obese rats and we further studied it more  
394 extensively.

395 Our studies demonstrate that IGFBP3 is, at least in part, responsible for mediating the  
396 proliferation of pancreatic beta cells. IGFBP3 is the most abundant IGF binding protein and, at the  
397 cellular milieu, IGFBP3 inhibits IGF1 and IGF2 action by preventing their interaction with type I IGF  
398 receptor (36). The cafeteria diet did not alter the expression levels of IGF1, but we found that this  
399 growth factor is secreted into the conditioned medium together with IGFBP3 (Supplemental Methods  
400 and Fig. 6). Since IGFBP3 is down-regulated in pMES adipose depot from obese rats, the decrease in  
401 the secretion of this protein enhances IGFs action. These growth factors are well known mitogens  
402 whose effects have been reported in beta cell both in vitro (32, 48-51), and in vivo models (52, 53).  
403 Thus, the modulation of IGF1 action by the secretion of IGFBP3 could be one of the physiological  
404 mechanisms by which beta cell plasticity can be finely tuned, through the control of beta cell  
405 replication.

406 Our data demonstrate that IGF1 is mainly expressed in adipocytes while IGFBP3 is  
407 preferentially expressed in the stromal vascular fraction. While this same pattern has already been  
408 observed in other studies (54), the role these proteins play in adipose tissues is poorly understood. The  
409 current hypothesis suggests that they would act in a paracrine or autocrine manner regulating  
410 adipocyte differentiation and function. IGF1 stimulates adipogenesis, whereas IGFBP-3 has been  
411 shown to inhibit adipocyte differentiation (55) and glucose uptake (56). It has been suggested that an  
412 up-regulation of IGFBP3 in obesity could contribute to insulin resistance (57). Although our results do  
413 not support this theory, we have to bear in mind that each adipose depot behaves differently and  
414 therefore, depending on the depot situation, the obesity-induced changes could be different having  
415 various physiological consequences in its surrounding tissues.

416 Interestingly, we found a reduction in beta cell proliferation when IGFBP3 was added into the  
417 culture medium. Therefore, it is possible that IGFBP3 mediates these effects independently of IGF1.  
418 IGFBP-3 also shows very clear anti-proliferative and pro-apoptotic effects that do not involve IGFs  
419 (36), interacting with a variety of proteins or signaling pathways critical to cell cycle control and  
420 apoptosis. These IGFBP3 anti-proliferative and pro-apoptotic effects have also been reported in a beta  
421 cell line using a mutant that does not bind to IGF-1 and therefore, suggesting that IGFBP-3 can inhibit  
422 beta cell growth in an IGF-independent way (58).

423 IGFs and their binding proteins were first characterized as liver-derived endocrine factors.  
424 However, subsequent studies have shown that they are also synthesized and secreted by many non-  
425 hepatic tissues, including adipose tissue, where they carry out major autocrine and paracrine functions  
426 (59). Here we studied the involvement of adipocyte-derived IGFBP3 in the control of beta cell  
427 proliferation during the pathogenesis of obesity. It is possible to wonder how this factor reaches the  
428 pancreatic islets or beta cells in vivo. We measured serum IGFBP3 and IGF1 levels, and no changes  
429 were observed between diet-induced obese and lean rats (Supplemental Methods and Fig. 6). These  
430 results suggest that, on one hand, the contribution of visceral adipose tissue surrounding the pancreas  
431 to circulating IGFBP3 levels is small compared to liver or other adipose pads; and in the other hand,  
432 IGFBP3 actions in beta cell replication probably occur locally in a paracrine manner.

433           This paracrine action seems feasible since the only adipose depot from which the conditioned  
434 medium showed more proliferative properties with obesity is the pMES, located around the pancreas.  
435 Moreover, during the morphological characterization of the pancreas in our obesity model, we found  
436 some degree of infiltration of adipose tissue in the pancreas and some fat cells in close contact with  
437 pancreatic islets (Supplemental Fig. 7). This infiltration, which has previously been described in other  
438 studies (60-62), further supports a possible paracrine action of adipose tissue in the beta cell  
439 physiology, supporting the idea of a cross-talk between these two tissues.

440           In summary, our results show that changes in adipokine secretion profile of the adipose tissue  
441 surrounding the pancreas due to diet-induced obesity is able to increase the rate of beta cell replication.  
442 The IGFBP3 is the secreted protein responsible for this paracrinar action, through both dependent and  
443 independent IGF1 mechanisms. Taken together these results demonstrate a new mechanism to control  
444 beta cell plasticity.

445 **Acknowledgments**

446 We thank M. Julià for excellent technical assistance.



447 **References**

- 448 1. **Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR** 1997 Development of a  
449 novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*  
450 88:561-72
- 451 2. **Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC** 2003 Increased beta-cell apoptosis prevents  
452 adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet  
453 amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52:2304-14
- 454 3. **Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP** 2001 The continuing  
455 epidemics of obesity and diabetes in the United States. *Jama* 286:1195-200
- 456 4. **Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC** 2003 Beta-cell deficit and  
457 increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-10
- 458 5. **Bonner-Weir S** 2000 Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 141:1926-  
459 9
- 460 6. **Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA** 2004 Adult pancreatic beta-cells are formed by self-  
461 duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41-6
- 462 7. **Georgia S, Bhushan A** 2004 Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining  
463 postnatal beta cell mass. *J Clin Invest* 114:963-8
- 464 8. **Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA** 2007 Growth and regeneration of adult  
465 beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* 12:817-26
- 466 9. **Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K, Hara A, Toyoda Y,**  
467 **Miwa I, Aizawa S, Tsutsumi S, Tsubamoto Y, Hashimoto S, Eto K, Nakamura A, Noda M,**  
468 **Tobe K, Aburatani H, Nagai R, Kadowaki T** 2007 Glucokinase and IRS-2 are required for  
469 compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin*  
470 *Invest* 117:246-257
- 471 10. **Kulkarni RN, Holzenberger M, Shih DQ, Ozcan U, Stoffel M, Magnuson MA, Kahn CR**  
472 2002 beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose  
473 intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet* 31:111-5

- 474 11. **Okada T, Liew CW, Hu J, Hinault C, Michael MD, Krtzfeldt J, Yin C, Holzenberger M,**  
475 **Stoffel M, Kulkarni RN** 2007 Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory  
476 growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8977-82
- 477 12. **Ueki K, Okada T, Hu J, Liew CW, Assmann A, Dahlgren GM, Peters JL, Shackman JG,**  
478 **Zhang M, Artner I, Satin LS, Stein R, Holzenberger M, Kennedy RT, Kahn CR, Kulkarni**  
479 **RN** 2006 Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta cells causes overt diabetes. *Nat*  
480 *Genet* 38:583-8
- 481 13. **Xuan S, Kitamura T, Nakae J, Politi K, Kido Y, Fisher PE, Morroni M, Cinti S, White MF,**  
482 **Herrera PL, Accili D, Efstratiadis A** 2002 Defective insulin secretion in pancreatic beta cells  
483 lacking type 1 IGF receptor. *J Clin Invest* 110:1011-9
- 484 14. **Assmann A, Ueki K, Winnay JN, Kadowaki T, Kulkarni RN** 2009 Glucose effects on beta-cell  
485 growth and survival require activation of insulin receptors and insulin receptor substrate 2. *Mol*  
486 *Cell Biol* 29:3219-28
- 487 15. **Trayhurn P** 2005 Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta*  
488 *Physiol Scand* 184:285-93
- 489 16. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*  
490 89:2548-56
- 491 17. **Marques BG, Hausman DB, Martin RJ** 1998 Association of fat cell size and paracrine growth  
492 factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol* 275:R1898-908
- 493 18. **Claret M, Corominola H, Canals I, Saura J, Barcelo-Batllori S, Guinovart JJ, Gomis R** 2005  
494 Tungstate decreases weight gain and adiposity in obese rats through increased thermogenesis and  
495 lipid oxidation. *Endocrinology* 146:4362-9
- 496 19. **Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P** 2004 Glucose  
497 sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-  
498 1E insulinoma cells. *Endocrinology* 145:667-78

- 499 20. **Altirriba J, Barbera A, Del Zotto H, Nadal B, Piquer S, Sanchez-Pla A, Gagliardino JJ,**  
500 **Gomis R** 2009 Molecular mechanisms of tungstate-induced pancreatic plasticity: a transcriptomics  
501 approach. *BMC Genomics* 10:406
- 502 21. **Fernandez-Alvarez J, Barbera A, Nadal B, Barcelo-Batllori S, Piquer S, Claret M, Guinovart**  
503 **JJ, Gomis R** 2004 Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-  
504 rats treated with tungstate. *Diabetologia* 47:470-7
- 505 22. **Marzo N, Mora C, Fabregat ME, Martin J, Usac EF, Franco C, Barbacid M, Gomis R** 2004  
506 Pancreatic islets from cyclin-dependent kinase 4/R24C (Cdk4) knockin mice have significantly  
507 increased beta cell mass and are physiologically functional, indicating that Cdk4 is a potential  
508 target for pancreatic beta cell mass regeneration in Type 1 diabetes. *Diabetologia* 47:686-94
- 509 23. **Nielsen JH** 1982 Effects of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on insulin content  
510 and release, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. *Endocrinology*  
511 110:600-6
- 512 24. **Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP** 2003 Summaries of  
513 Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31:e15
- 514 25. **Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA** 2004 affy--analysis of Affymetrix GeneChip data  
515 at the probe level. *Bioinformatics* 20:307-15
- 516 26. **Liu WM, Mei R, Di X, Ryder TB, Hubbell E, Dee S, Webster TA, Harrington CA, Ho MH,**  
517 **Baid J, Smeekens SP** 2002 Analysis of high density expression microarrays with signed-rank call  
518 algorithms. *Bioinformatics* 18:1593-9
- 519 27. **Tusher VG, Tibshirani R, Chu G** 2001 Significance analysis of microarrays applied to the  
520 ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5116-21
- 521 28. **Li C, Wong WH** 2001 Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index  
522 computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:31-6
- 523 29. **Prats E, Monfar M, Castella J, Iglesias R, Alemany M** 1989 Energy intake of rats fed a  
524 cafeteria diet. *Physiol Behav* 45:263-72

- 525 30. **Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K,**  
526 **Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R,**  
527 **Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T** 2000 Disruption of insulin receptor substrate 2  
528 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell  
529 hyperplasia. *Diabetes* 49:1880-9
- 530 31. **Cousin SP, Hugl SR, Myers MG, Jr., White MF, Reifel-Miller A, Rhodes CJ** 1999 Stimulation  
531 of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction  
532 via janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no  
533 crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling. *Biochem J* 344 Pt 3:649-58
- 534 32. **Hugl SR, White MF, Rhodes CJ** 1998 Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic  
535 beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-  
536 mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem*  
537 273:17771-9
- 538 33. **Nielsen H, Brunak S, von Heijne G** 1999 Machine learning approaches for the prediction of  
539 signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng* 12:3-9
- 540 34. **Baumbach WR, Horner DL, Logan JS** 1989 The growth hormone-binding protein in rat serum  
541 is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes Dev* 3:1199-205
- 542 35. **Dastot F, Duquesnoy P, Sobrier ML, Goossens M, Amselem S** 1998 Evolutionary divergence of  
543 the truncated growth hormone receptor isoform in its ability to generate a soluble growth hormone  
544 binding protein. *Mol Cell Endocrinol* 137:79-84
- 545 36. **Yamada PM, Lee KW** 2009 Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic  
546 action. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C954-76
- 547 37. **Barandier C, Montani JP, Yang Z** 2005 Mature adipocytes and perivascular adipose tissue  
548 stimulate vascular smooth muscle cell proliferation: effects of aging and obesity. *Am J Physiol*  
549 *Heart Circ Physiol* 289:H1807-13

- 550 38. **Yin N, Wang D, Zhang H, Yi X, Sun X, Shi B, Wu H, Wu G, Wang X, Shang Y** 2004  
551 Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin. *Cancer*  
552 *Res* 64:5870-5
- 553 39. **Schinner S, Ulgen F, Papewalis C, Schott M, Woelk A, Vidal-Puig A, Scherbaum WA** 2008  
554 Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by  
555 adipocyte-derived Wnt signalling molecules. *Diabetologia* 51:147-54
- 556 40. **Pond CM, Mattacks CA** 1998 In vivo evidence for the involvement of the adipose tissue  
557 surrounding lymph nodes in immune responses. *Immunol Lett* 63:159-67
- 558 41. **Greenberg AS, Obin MS** 2006 Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and  
559 metabolism. *Am J Clin Nutr* 83:461S-465S
- 560 42. **Attallah H, Friedlander AL, Hoffman AR** 2006 Visceral obesity, impaired glucose tolerance,  
561 metabolic syndrome, and growth hormone therapy. *Growth Horm IGF Res* 16 Suppl A:S62-7
- 562 43. **Kissebah AH, Vydellingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW**  
563 1982 Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol*  
564 *Metab* 54:254-60
- 565 44. **Vague J** 1996 The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining  
566 predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. 1956. *Obes Res* 4:204-  
567 12
- 568 45. **Kawano Y, Kypta R** 2003 Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*  
569 116:2627-34
- 570 46. **Papadopoulou S, Edlund H** 2005 Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not  
571 pancreatic function. *Diabetes* 54:2844-51
- 572 47. **Rulifson IC, Karnik SK, Heiser PW, ten Berge D, Chen H, Gu X, Taketo MM, Nusse R,**  
573 **Hebrok M, Kim SK** 2007 Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl*  
574 *Acad Sci U S A* 104:6247-52

- 575 48. **Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, Hugl SR, Snow L, Kahn BB, Myers MG, Jr., Rhodes**  
576 **CJ** 2001 Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like  
577 growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 276:21110-20
- 578 49. **Hogg J, Han VK, Clemmons DR, Hill DJ** 1993 Interactions of nutrients, insulin-like growth  
579 factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat  
580 islets of Langerhans. *J Endocrinol* 138:401-12
- 581 50. **Lingohr MK, Dickson LM, McCuaig JF, Hugl SR, Twardzik DR, Rhodes CJ** 2002 Activation  
582 of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF-alpha or EGF, augments pancreatic  
583 beta-cell proliferation. *Diabetes* 51:966-76
- 584 51. **Sieradzki J, Fleck H, Chatterjee AK, Schatz H** 1988 Stimulatory effect of insulin-like growth  
585 factor-I on [3H]thymidine incorporation, DNA content and insulin biosynthesis and secretion of  
586 isolated pancreatic rat islets. *J Endocrinol* 117:59-62
- 587 52. **George M, Ayuso E, Casellas A, Costa C, Devedjian JC, Bosch F** 2002 Beta cell expression of  
588 IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *J Clin Invest* 109:1153-63
- 589 53. **Petrik J, Pell JM, Arany E, McDonald TJ, Dean WL, Reik W, Hill DJ** 1999 Overexpression of  
590 insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia.  
591 *Endocrinology* 140:2353-63
- 592 54. **Peter MA, Winterhalter KH, Boni-Schnetzler M, Froesch ER, Zapf J** 1993 Regulation of  
593 insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white  
594 adipose tissue. *Endocrinology* 133:2624-31
- 595 55. **Chan SS, Schedlich LJ, Twigg SM, Baxter RC** 2009 Inhibition of adipocyte differentiation by  
596 insulin-like growth factor-binding protein-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E654-63
- 597 56. **Chan SS, Twigg SM, Firth SM, Baxter RC** 2005 Insulin-like growth factor binding protein-3  
598 leads to insulin resistance in adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6588-95
- 599 57. **Baxter RC, Twigg SM** 2009 Actions of IGF binding proteins and related proteins in adipose  
600 tissue. *Trends Endocrinol Metab* 20:499-505

601 58. **Chen X, Ferry RJ, Jr.** 2006 Novel actions of IGFBP-3 on intracellular signaling pathways of  
602 insulin-secreting cells. *Growth Horm IGF Res* 16:41-8

603 59. **Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A** 2001 The somatomedin hypothesis: 2001.  
604 *Endocr Rev* 22:53-74

605 60. **Olsen TS** 1978 Lipomatosis of the pancreas in autopsy material and its relation to age and  
606 overweight. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 86A:367-73

607 61. **Pinnick KE, Collins SC, Londos C, Gauguier D, Clark A, Fielding BA** 2008 Pancreatic ectopic  
608 fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition. *Obesity (Silver Spring)*  
609 16:522-30

610 62. **Ulgen F, Scherbaum WA, Partke HJ, Bornstein SR, Schinner S** 2008 Intrapancreatic adipocyte  
611 deposition in a mouse model of the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 40:507-9

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628 **Legend Figures**

629

630 **FIG. 1. Effect of cafeteria diet on body and adipose tissue weight.**

631 Body weight evolution of diet-induced obese and lean rats. (A; *white circles*, lean; *black circles*,  
632 obese). Weight of three different adipose tissue depots after 30 or 60 days of cafeteria diet.(B; *white*  
633 *bars*, lean; *black bars*, obese). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from 4 to 12 animals per group. \*,  
634  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.01$  for obese vs. lean rats for the same diet period.

635

636 **FIG. 2. The administration of cafeteria diet alters glucose tolerance .**

637 Glycemia (*left panels A, C*) and insulinemia (*right panels B, D*) were determined during an  
638 intraperitoneal glucose sensitivity test as described in the materials and methods section in lean (*white*  
639 *circles*) and diet-induced obese rats (*black circles*) after 30 (A, B) or 60 (C, D) days of diet. Areas  
640 under the curve (AUC) for glycemia and insulinemia were also calculated (E, F; *white bars*, lean;  
641 *black bars*, obese). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from 4 to 10 animals per group. \*,  $P < 0.05$  and  
642 \*\*,  $P < 0.01$  for obese vs. lean rats for the same diet period.

643

644 **FIG. 3. Cafeteria diet increases beta cell proliferation.**

645 The analysis of pancreas morphometry was performed as detailed in the materials and methods  
646 section. Percentage of insulin stained area per whole pancreas area (A), islet size assessed by insulin  
647 stained area per islet (B), number of islets per area of pancreas (C) and percentage of beta cell  
648 replication assessed by Ki67 staining (D) was measured in lean (*white bars*) and diet-induced obese  
649 rats (*black bars*). The results are expressed as mean  $\pm$  SEM (A, C, D) or box plot (B) from 4 to 7  
650 animals per experimental group. \*,  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.01$  for obese vs. lean rats for the same diet  
651 period.

652

653 **FIG. 4. Beta cell proliferation induced by conditioned media from different adipose tissue**  
654 **depots.**



655 Three adipose tissues (pMES, eWAT and iSUB) obtained after 30 and 60 days of cafeteria diet were  
656 used to produce the conditioned medium. Proliferation of INS1E cells was determined after being  
657 cultured in the different conditioned medium from lean (*white bars*) and diet-induced obese rats (*black*  
658 *bars*) after 30 (A) or 60 (B) days of diet. Effect of glucose concentration on INS1E cells proliferation  
659 cultured with pMES conditioned medium from lean (*white bars*) and diet-induced obese (*black bars*)  
660 rats after 30 days of diet (C). Effect of heat inactivation of the pMES conditioned medium of lean  
661 (*white bars*) and diet-induced obese (*black bars*) rats of 30 days of diet on INS1E cells proliferation  
662 (D). Proliferation in rat islets cultured with pMES conditioned medium from lean (*white bars*) and  
663 diet-induced obese (*black bars*) rats after 30 days of diet (E). In all cases, the proliferation induced by  
664 conditioned media in INS1E cells is normalized with a control non-conditioned medium included in  
665 each experiment; and standardized to the proliferation induced by the mean of the lean rats. In the  
666 glucose experiments, the results were normalized with the results at 5.5 mM concentration. Data are  
667 expressed as mean  $\pm$  SEM of 4 to 6 independent experiments, each performed with conditioned media  
668 from different animals. \*, P<0.05 and \*\*, P<0.01 for diet-induced obese vs. lean rats. #, P<0.05 for 15  
669 mM vs. 5,5 mM glucose concentration.

670

671 **FIG. 5. List of secreted genes differentially expressed between diet-induced obese and lean**  
672 **animals.**

673 In the table, the genes that codify for secreted proteins selected from the microarray list of genes  
674 differentially expressed in pMES adipose tissue between diet-induced obese and lean rats after 30  
675 days of cafeteria diet are listed. The heat diagram on the left of the table represents the expression  
676 level of each gene, increased (red) or reduced (blue), in each microarray. In the table the genes  
677 implicated in proliferation processes are shown on a grey shading, their effect on proliferation,  
678 induction (+) or inhibition (-), is also indicated. FC (Fold Change): ratio of expression between the  
679 group of obese and lean rats.

680

681 **FIG. 6. Gene expression levels of the possible candidates for the pMES-induced effect on beta**  
682 **cell replication.**

683 Levels of mRNA expression of genes implicated in proliferative processes were measured in pMES,  
684 eWAT and, in some cases, iSUB adipose tissues from lean (*white bars*) and diet-induced obese rats  
685 (*black bars*) after 30 days of diet. The expression of each gene was assessed by quantitative PCR and  
686 normalized with the constitutive expression of the gene Tbp (TATA binding protein). The results are  
687 the mean  $\pm$  SEM from 7 to 9 animals per experimental group. \*, P<0.05 and \*\*, P<0.01 for diet-  
688 induced obese vs. lean rats gene expression in the same adipose depot.

689

690 **FIG. 7. Igfbp3 and Igf1 expression levels in adipose tissue of diet-induced obese and lean**  
691 **animals.**

692 Protein expression of Igfbp3 in pMES (A) and eWAT (B) adipose tissue analyzed by Western Blot.  
693 Representative immunoblots and densitometric analysis of three independent experiments are shown  
694 (5 animals per experimental group). The Igfbp3 protein expression was normalized by the constitutive  
695 expression of  $\beta$ -actin (lean, *white bars*; diet-induced obese rats, *black bars*). Levels of Igfbp3 (C) and  
696 Igf1 (D) mRNA expression in total adipose tissue, stromal fraction and isolated adipocytes from  
697 pMES, eWAT and iSUB adipose depots of lean (*white bars*) and diet-induced obese (*black bars*) rats  
698 after 30 days of diet. The expression of each gene was obtained by quantitative PCR and normalized  
699 with the constitutive expression of the gene Tbp. The results are the mean  $\pm$  SEM from 7 to 9 animals  
700 per experimental group. \*, P<0.05 and \*\*, P<0.01 for diet-induced obese vs. lean rats gene expression  
701 in the same adipose depot.

702

703 **FIG. 8. Role of Igfbp3 in the pMES conditioned medium effect on INS1E cells proliferation.**

704 The proliferation of INS1E cells was measured as described in materials and method section in  
705 presence (+) or absence (-) of recombinant Igfbp3 in non conditioned media or conditioned media  
706 from diet-induced obese pMES (A; *grey bars*, non conditioned media; *black bars*, obese media). The  
707 proliferation of INS1E cells was measured in the presence (+) or absence (-) of an Igfbp3 antibody in

708 non conditioned media or conditioned media from lean pMES (B; *grey bars*, non conditioned media;  
709 *white bars*, lean media). The results are the mean  $\pm$  SEM of 4-5 independent experiments, each  
710 performed with conditioned media from different animals. In all cases, the proliferation induced by the  
711 different mediums was normalized to the non-conditioned medium included in each experiment. \*,  
712  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.01$  for medium with Igfbp3 recombinant protein/antibody vs. media without them.

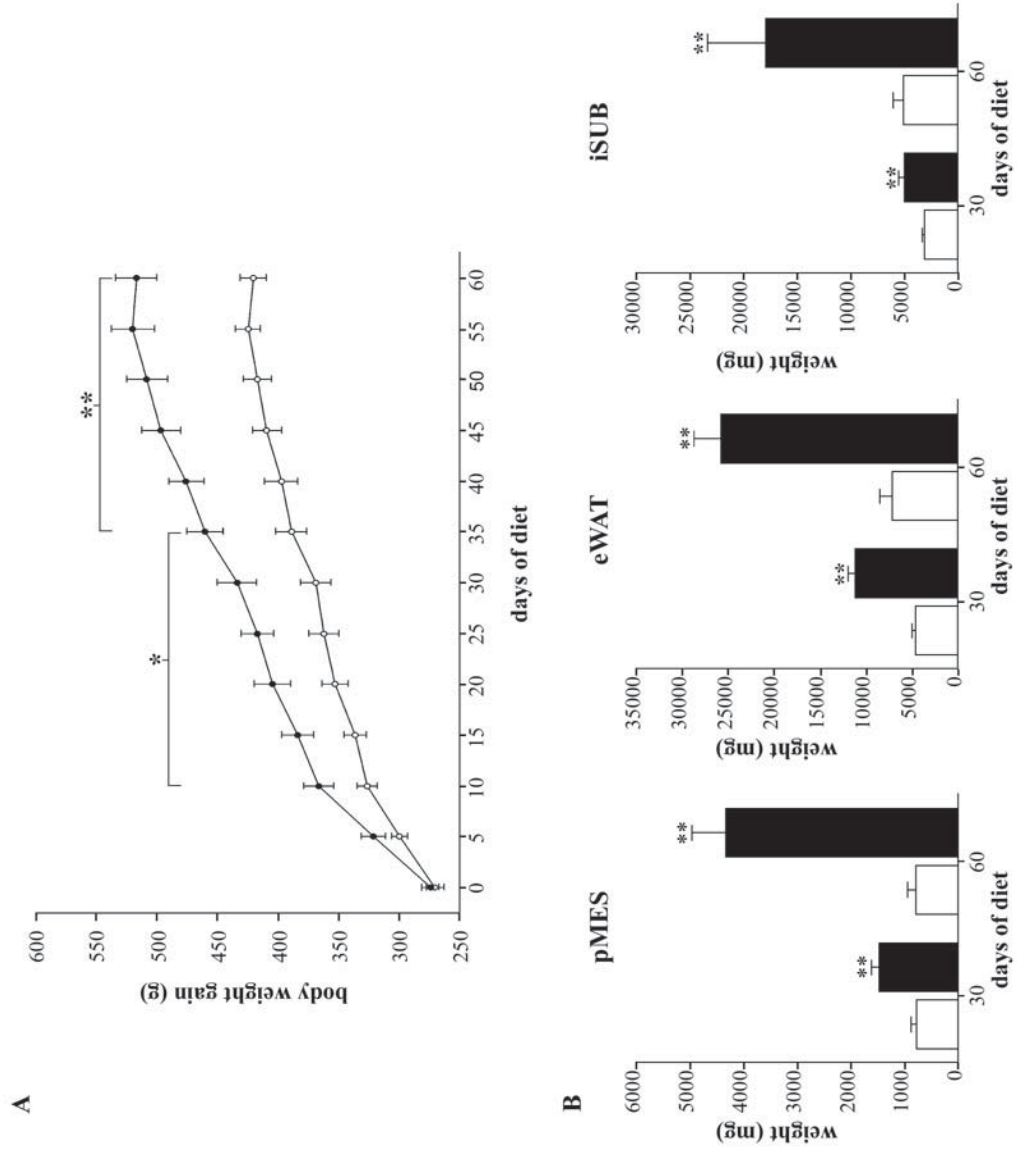
713

714

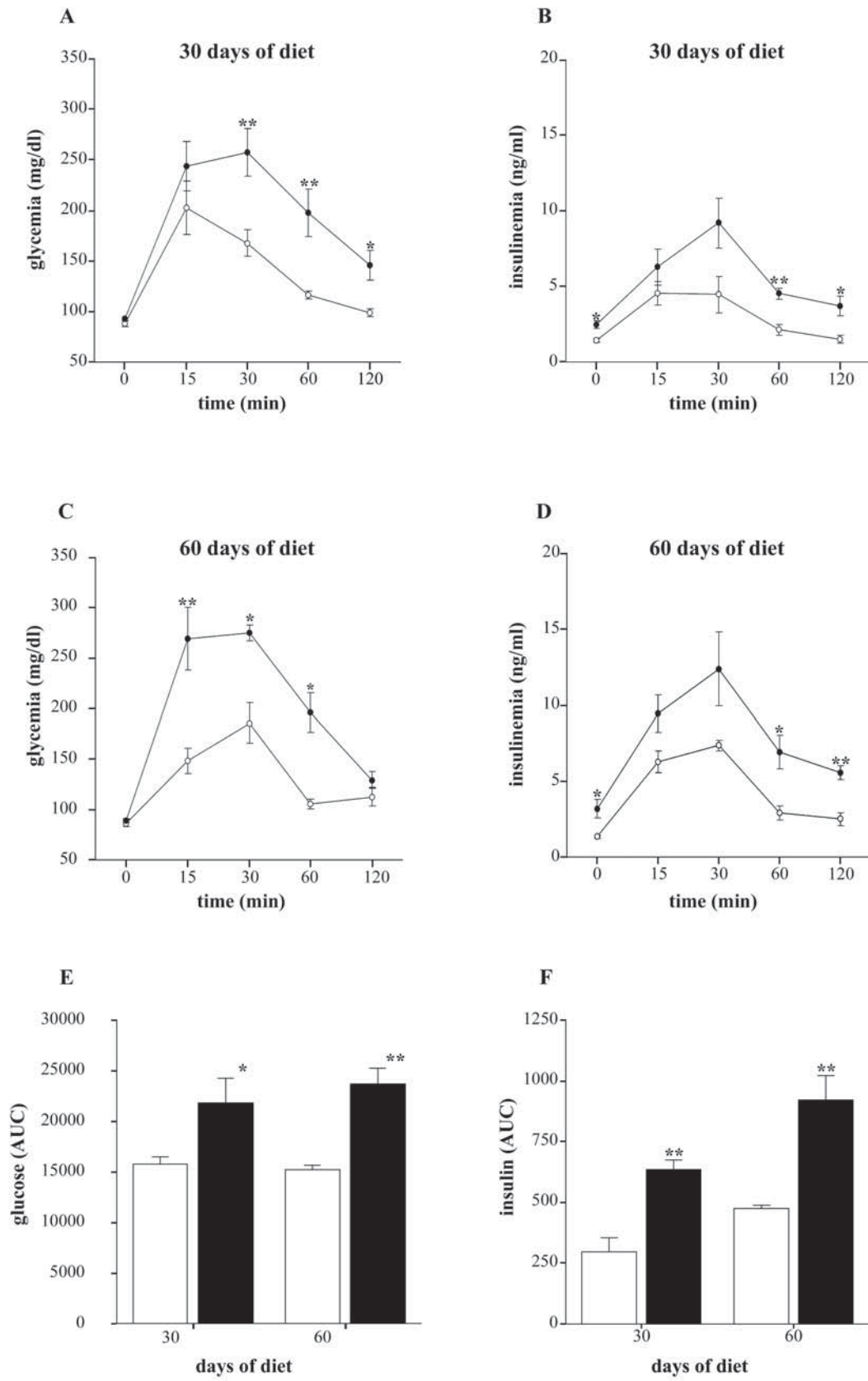
715

716

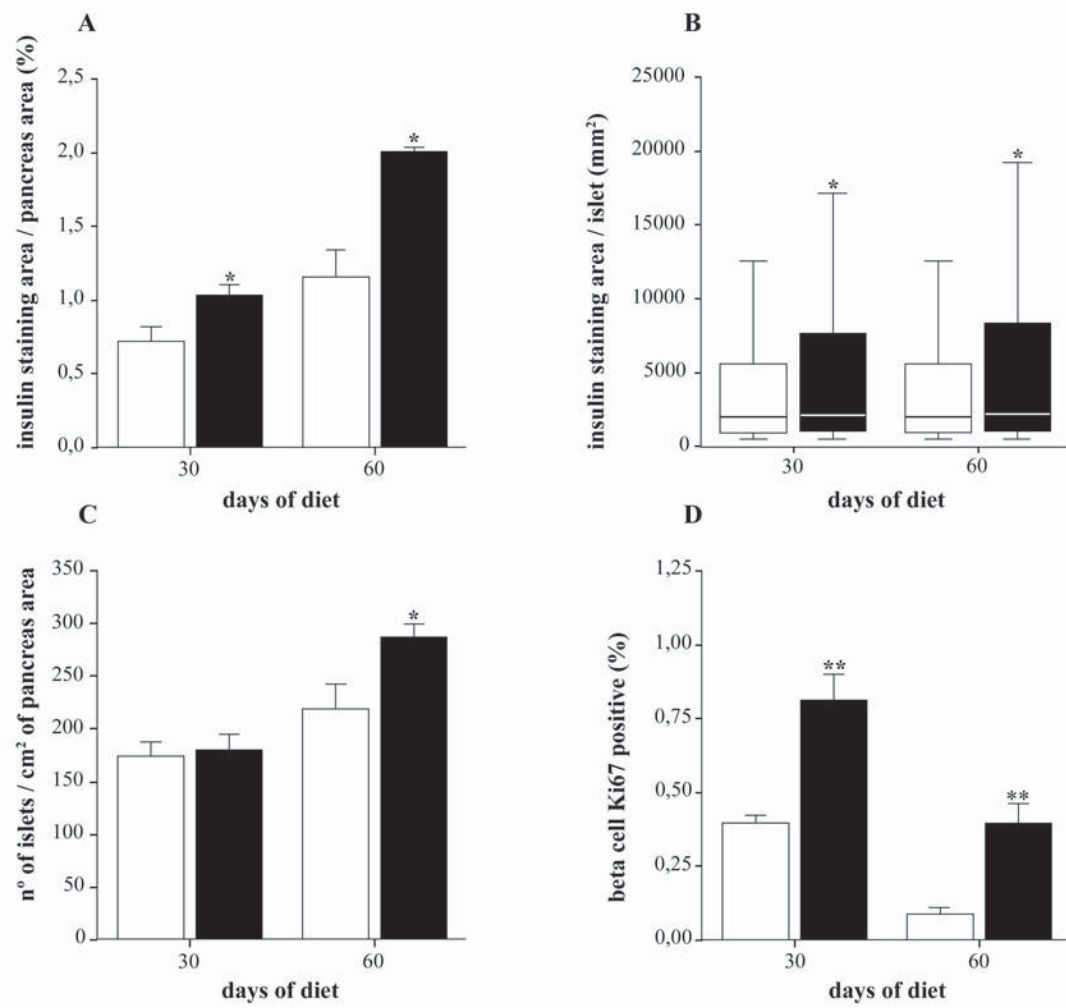
**FIGURE 1**



**FIGURE 2**

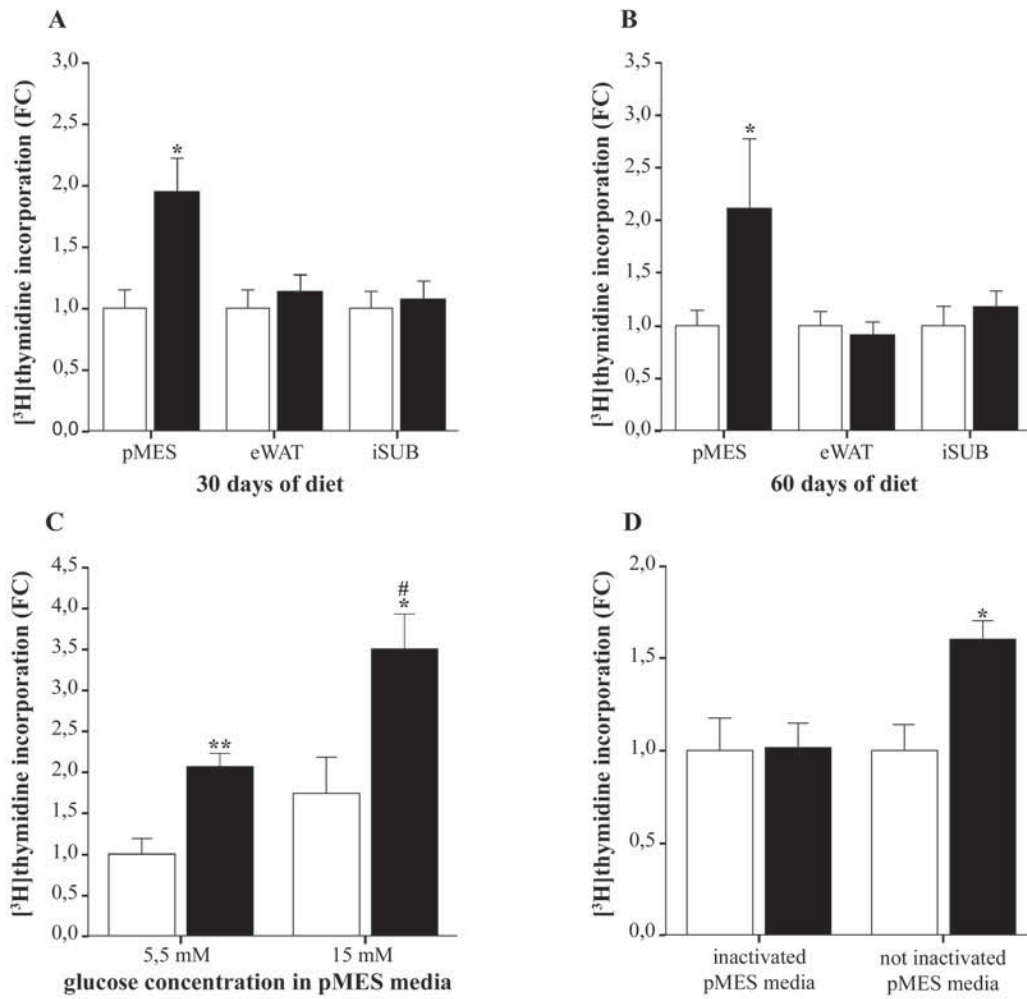


**FIGURE 3**

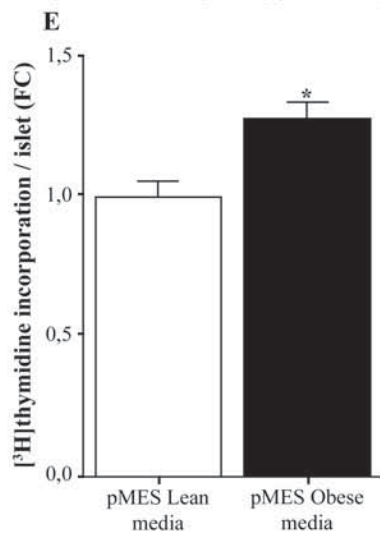


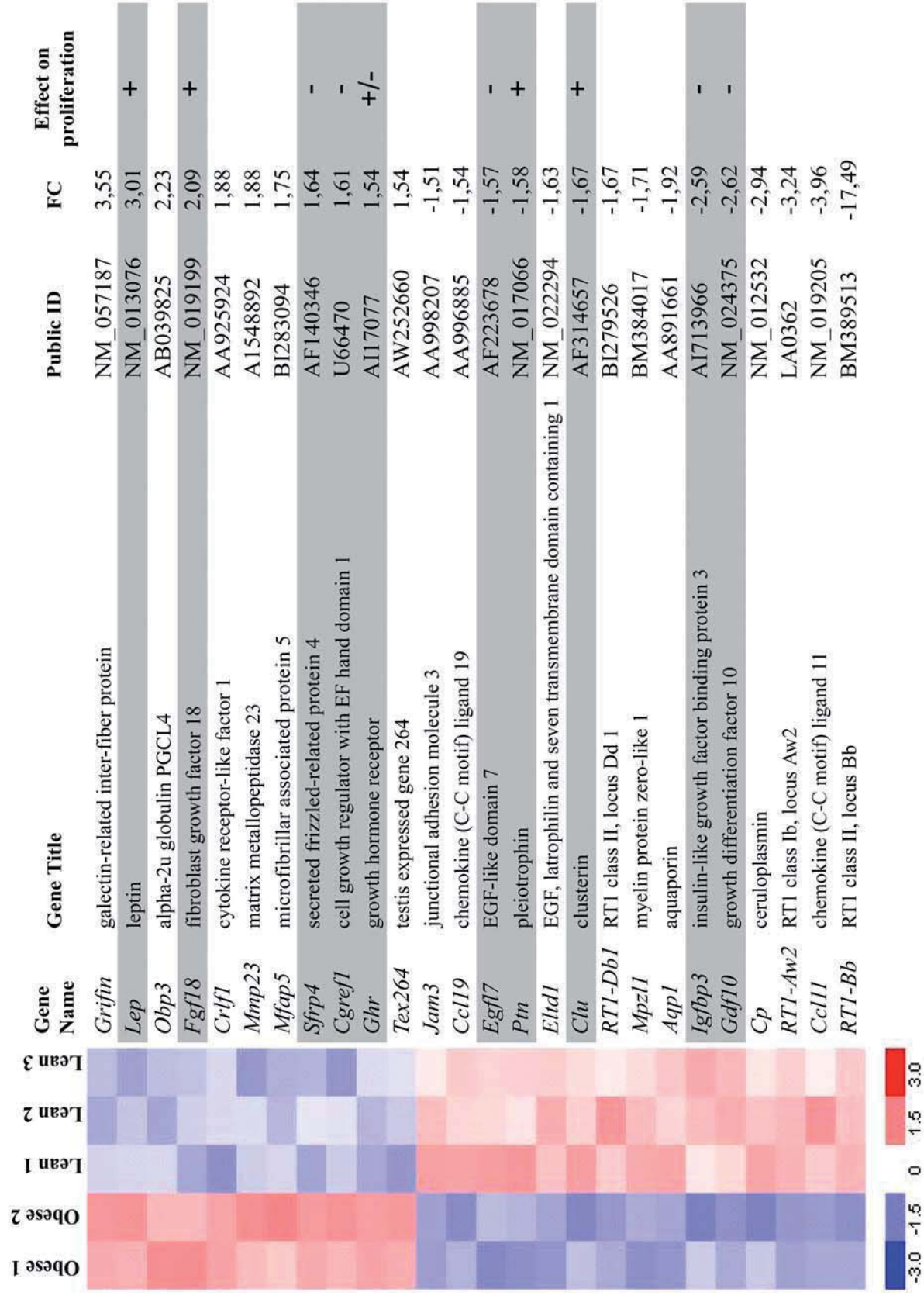
**FIGURE 4**

**PROLIFERATION ASSAYS IN INS1E CELLS**

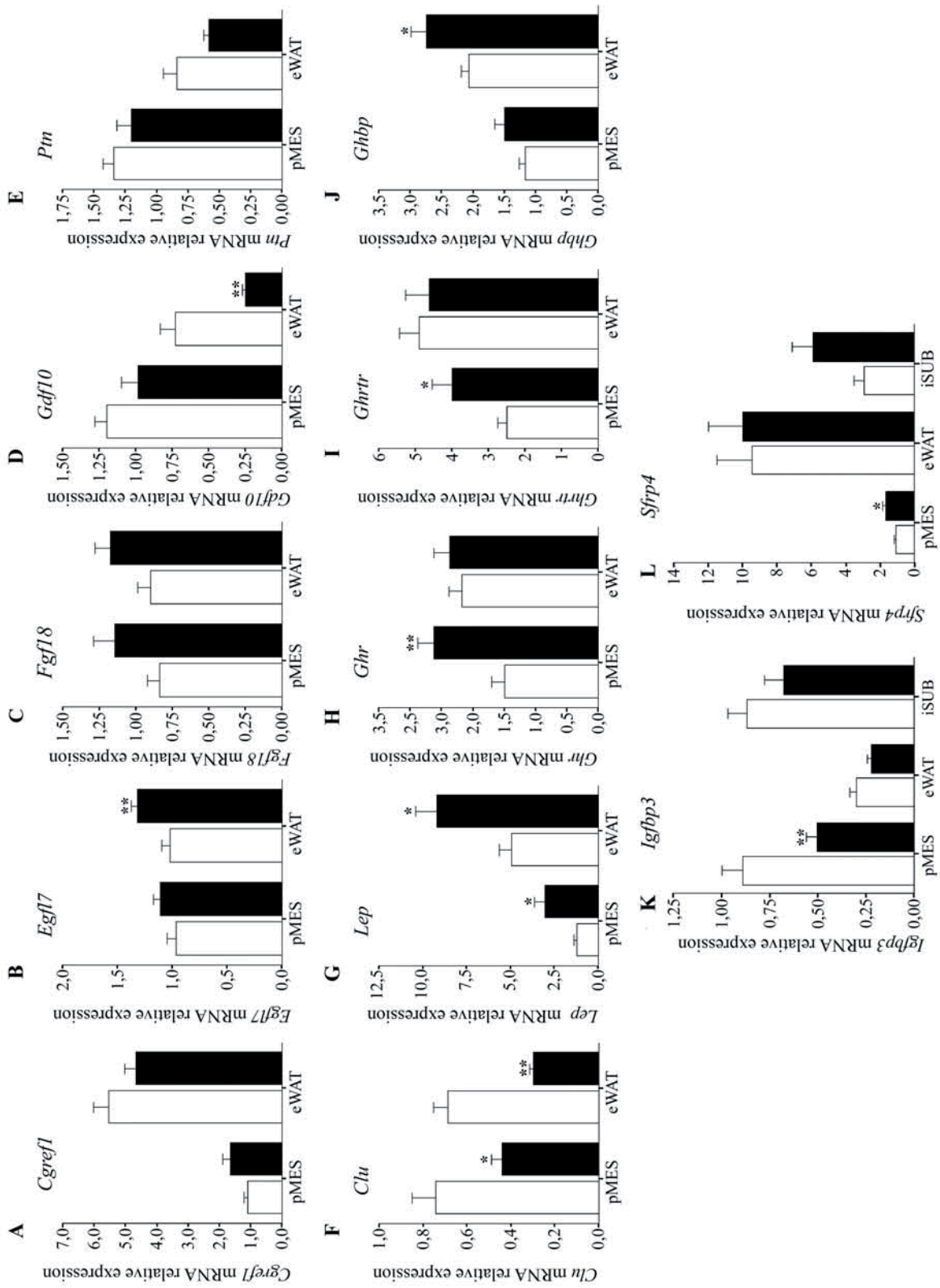


**PROLIFERATION ASSAY IN ISLETS**

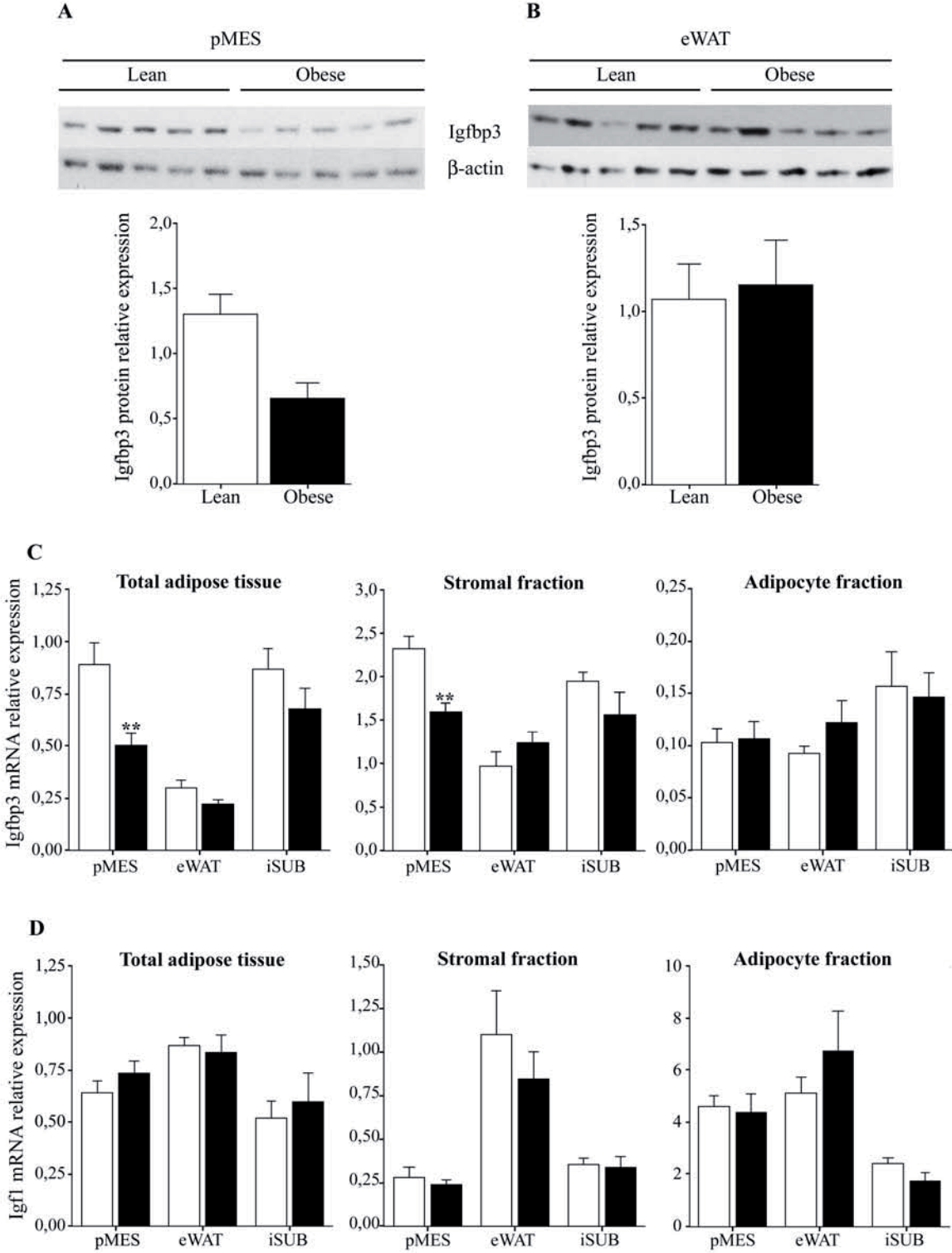


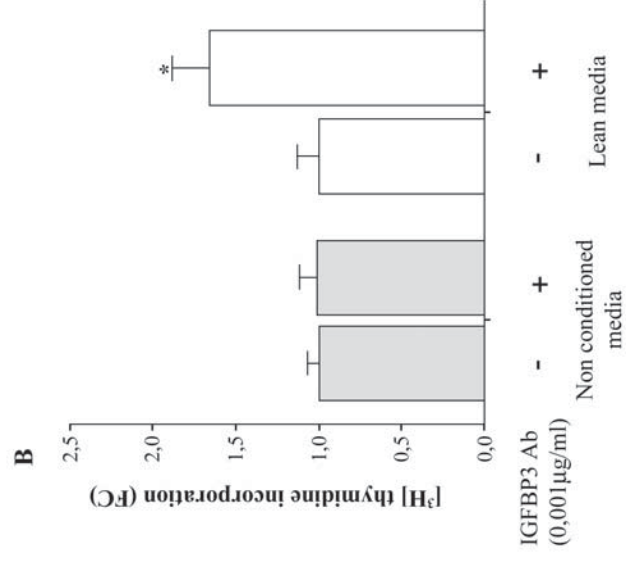
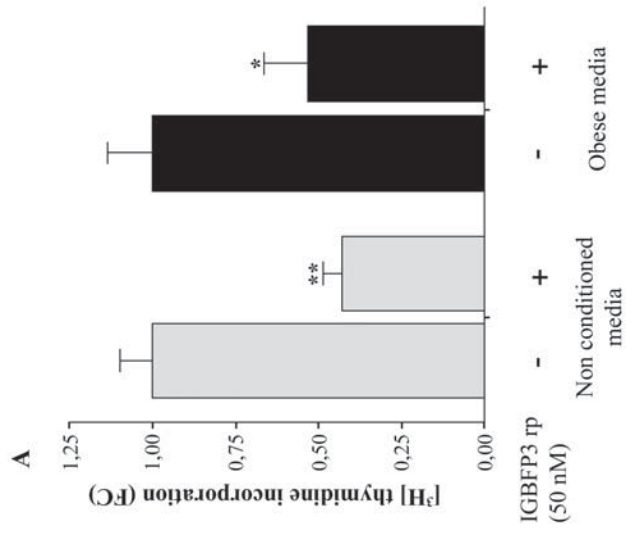






**FIGURE 7**





## **SUPPLEMENTARY METHODS 1**

### **Affymetrix quality controls**

Our arrays were submitted to the quality controls established by Affymetrix (1), through the package simpleaffy (2), from the Bioconductor core and R environment, and the examination of the .dat and .rpt files (done by the software provided by Affymetrix MAS version 5.0).

#### 1.- Probe Array Image Inspection

A general visual inspection of the different arrays (.dat files) was done without observing any evident problems (scratches, saturation areas, etc.).

#### 2.- B2 Oligo Performance

The pattern of intensities (border and corner pattern and the array name) done by B2 Oligo was observed clearly in the arrays.

#### 3.- Average Background and Noise Values

The Average Background and Noise (RawQ) was similar among the arrays, having a median of 1.61 and a range of 1.57-1.89.

#### 4.- Hybridization Controls: bioB, bioC, bioD and cre.

All hybridization controls were called “Present” and bioB, bioC, bioD and cre have respectively increasing signal values.

#### 5.- Internal Control Genes: GAPDH and $\beta$ -actin.

The ratio of the 3' to the 5' probe set was always no more than 3. GAPDH: range between 1 and 1.2 with a median of 1.2.  $\beta$ -actin: range between 1.6 and 2.6 with a median of 2.3.

#### 6.- Percent Present

The percentage of genes called Present remained consistent across the arrays, being into the range of 59.80 - 64.70% with a median of 62.70%.

#### 7.- Scaling and Normalization Factors

Applying a global scaling with a Target Intensity value of 250 the scaling factor was very similar among all the arrays (median 0.76, range 0.565-0.786).

Therefore, we could conclude that arrays had passed all the Affymetrix quality controls.

1. Affymetrix, Inc. “GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals” [[https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data\\_analysis\\_fundamentals\\_manual.pdf](https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf)]

2. **Wilson CL, Miller CJ** 2005 Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis. *Bioinformatics* 21(18):3683-5.

## **SUPPLEMENTARY METHODS 2**

### **Statistical Quality Control**

Histogram and box plot analysis of the raw data were performed with Affy package (1) (Fig. S1 *A* and *B*), observing that all the arrays had a similar range of intensities and there was not signal saturation at the highest intensities. Moreover, by plotting the histograms and the boxplots of the background adjusted, normalized and summarized raw data by Robust Multi-array Analysis (RMA) (2) (Figs. S1 *C* and *D*), we could observe that the expression values are very homogeneous among the arrays, which permit us to make further analysis.

Furthermore, the arrays passed the outlier detection algorithm described by Li And Wong (3), which was applied when the model-based expression measures were calculated by the PM only and the PM/MM model.

Moreover, we fitted to the raw data a robust linear model by iteratively reweighted least squares, with the parameters probes and samples. Chip image plots of the weights from the robust linear model fit were drawn (data not show), without detecting any evident problem. Additionally, boxplots of the normalized unscaled standard errors (NUSE boxplot, Fig. S2 *A* and *C*) and boxplots of the distribution of the relative logarithmic expressions (RLE boxplot, Fig. S2 *B* and *D*) were plotted, observing a similar tendency in all the arrays (the boxes were in a similar range). These observations were done using the AffyPLM package (4).

Therefore, we concluded that there wasn't any outlier among the arrays.

### **Versions used**

Affy package (version 1.10.0 and AffyPLM package (version 1.8.0) from Bioconductor (4) were performed on R language (6,7) (version 2.3.1).

The outlier detection algorithm described by Li and Wong were performed with dChip (version Sep 2005).

All the scripts are available under request.

1. **Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA** 2004 affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20(3):307-15.
2. **Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP** 2003 Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31(4):e15.
3. **Li C, Wong WH** 2001 Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(1):31-6. [<http://www.dchip.org>]
4. **Bolstad BM** 2004 Low level analysis of high-density oligonucleotide array data: Background, normalization and summarization. Dissertation. University of California, Berkeley.
5. **Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J** 2004 Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5(10):R80. [<http://www.bioconductor.org>]
6. **Ihaka R and Gentleman R** 1996 R: A language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics* (5)3:e15.
7. **R: Development core team** 2004 R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Viena, Austria. [<http://www.r-project.org>]

### **SUPPLEMENTARY METHODS 3**

#### **Metabolic measurements**

Animals were fasted 5 h before glucose and insulin measurements and 4 h for NEFA, Igf1 and Igfbp3 measurements.

Blood glucose levels were measured using an automatic glucose monitoring device (AccuTrend glucose sensor, Roche, Mannheim, Germany).

Plasma insulin levels were measured by ELISA from Mercodia (Uppsala, Sweden).

Serum nonesterified fatty acids (NEFA) levels were measured using a colorimetric kit from Wako (Neuss, Germany).

Insulin-like growth factor I levels in serum and conditioned medium were measured by ELISA from R&D (Minneapolis, EEUU).

Insulin-like growth factor binding protein 3 levels in serum were measured by the Western Ligand technique (1,2) using a commercial kit from Immunological & Biochemical Testsystems (Reutlingen, Germany).

1. **Fowlkes JL, Serra D** 1996 A rapid, non-radioactive method for the detection of insulin-like growth factor binding proteins by Western ligand blotting. *Endocrinology* 137:5751-4
2. **Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Binoux M** 1986 Identification of an insulin-like growth factor-binding protein in human cerebrospinal fluid with a selective affinity for IGF-II. *FEBS Lett* 208:439-44

#### **SUPPLEMENTARY METHODS 4**

##### **Histologic and morphometric analysis of adipose tissue**

Formalin-fixed pMES specimens were dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 5  $\mu\text{m}$  thick sections. Adipose tissue sections were stained with hematoxylin and eosin, following standard protocols. The cross-sectional areas were measured with Leica DRM software (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

## Supplementary figures and tables legends

### **SF1. Statistical quality controls of the microarrays: Raw and normalized data behaviour.**

Figure described in supplementary material and methods 2. Boxplots and histograms of the raw data (*A and B*) and the background adjusted, normalized and summarized data by RMA (*C and D*).

### **SF2. Statistical quality controls of the microarrays: AffyPLM assessment quality control.**

Figure described in supplementary material and methods 2. Boxplots of the normalized unscaled standard errors (NUSE boxplot, *A [magnificated]* and *C*) and boxplots of the distribution of the relative logarithmic expressions (RLE boxplot, *B [magnificated]* and *C*).

### **SF3. Biochemical parameters in basal state.**

Values of blood glucose (*A*), plasma insulin (*B*) and serum nonesterified fatty acids (NEFA) (*C*) in basal state. Control / lean rats (*white bars*), cafeteria / obese rats (*black bars*). The results are the mean  $\pm$  SEM from 4 to 10 animals per experimental group. \*,  $P < 0,05$  and \*\*,  $P < 0,01$  for obese vs. lean rats of the same diet treatment period. For related material and methods see supplementary material and methods 3.

### **SF4. Igfbp3 and Igf1 expression levels in stromal and adipocyte fraction of adipose tissue.**

Levels of Igfbp3 (*A*) and Igf1 (*B*) mRNA expression in stromal (*white bars*) and adipocyte (*black bars*) fraction of control rats adipose tissue. The expression of each gene was obtained by quantitative PCR and normalized with respect to the constitutive expression of the gene *Tbp*. The results are the mean  $\pm$  SEM from 7 to 9 animals per experimental group. \*,  $P < 0,05$  and \*\*,  $P < 0,01$  for adipocyte vs. stromal fraction of the same adipose depot.

### **SF5. Adipocyte hypertrophy induced by cafeteria diet.**

Hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded sections of pMES adipose tissue of lean (*A*) and obese (*B*) rats after 30 days of diet. Morphometric analysis of pMES adipose tissue showing the increase of adipocyte surface area in obese rats (*C*). The results are the mean  $\pm$  SEM from 5 animals per experimental group. \*\*  $P < 0,01$  for obese vs. lean rats. For related material and methods see supplementary material and methods 4.

### **SF6. Concentration of Igfbp3 in serum and Igf1 in conditioned medium.**

A, Quantification of Igfbp3 by Western Ligand in sera from lean and obese rats of 30 days of diet. A representative immunoblot and densitometric analysis of both bands corresponding to



Igfbp3 are shown. The upper band (45 kDa) correspond to the entire Igfbp3 protein and the lower band (30 KDa) is a fragment of Igfbp3 after been proteolyzed. The results are the mean  $\pm$  SEM of 11 to 12 animals per experimental group. B, Quantification of Igf1 by ELISA in sera from lean and obese rats after 30 days of diet. The results are the mean  $\pm$  SEM of 20 animals per experimental group. C, Quantification of Igf1 by ELISA in conditioned media of pMES, eWAT and iSUB adipose tissue from lean and obese rats after 30 days of diet. The results are the mean  $\pm$  SEM from 5 to 9 animals per experimental group. Control / lean rats (*white bars*), cafeteria / obese rats (*black bars*). In all cases statistical analysis was conducted by nonparametric Mann-Whitney U test due to non normal distribution of the data. \*  $p < 0,05$  for obese vs. lean rats. For related material and methods see supplementary material and methods 2.

#### **SF7. Contact of adipose tissue and islets.**

Representative images of pancreatic paraffin-embedded sections of obese rats after 60 days of cafeteria diet showing islets in close contact with adipocytes. The sections were stained with insulin by indirect peroxidase technique and counterstained with toluidine blue dye. Related material and methods are described in the main text of article.

#### **ST 1. Primers used in quantitative PCR assays.**

Description of the primers used in quantitative PCR assays.

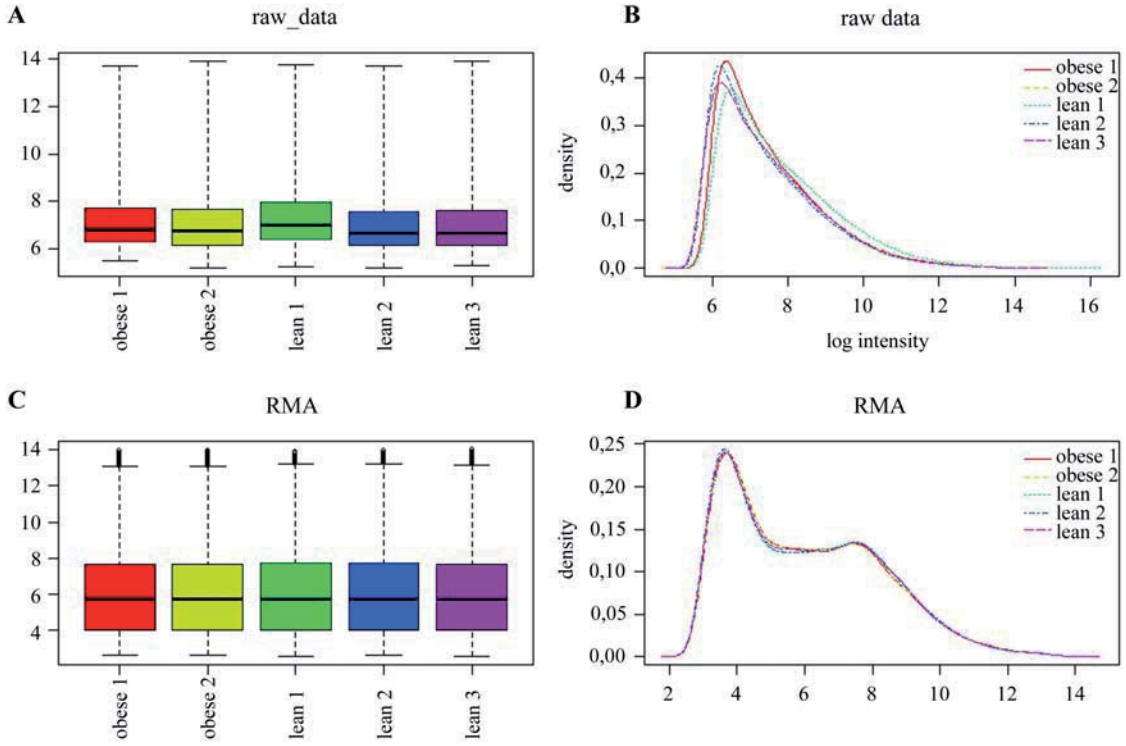
#### **ST 2. Genes differentially expressed in pMES adipose tissue between lean and obese rats after 30 days of diet.**

Description of 213 differentially expressed genes in pMES adipose tissue between lean and obese rats after 30 days of diet, obtained by microarray analysis. For each gene are indicated its probe set, gene symbol, gene title, representative public ID and ratio of expression between the obese and lean groups (FC). Related material and methods are described in the main text of article.

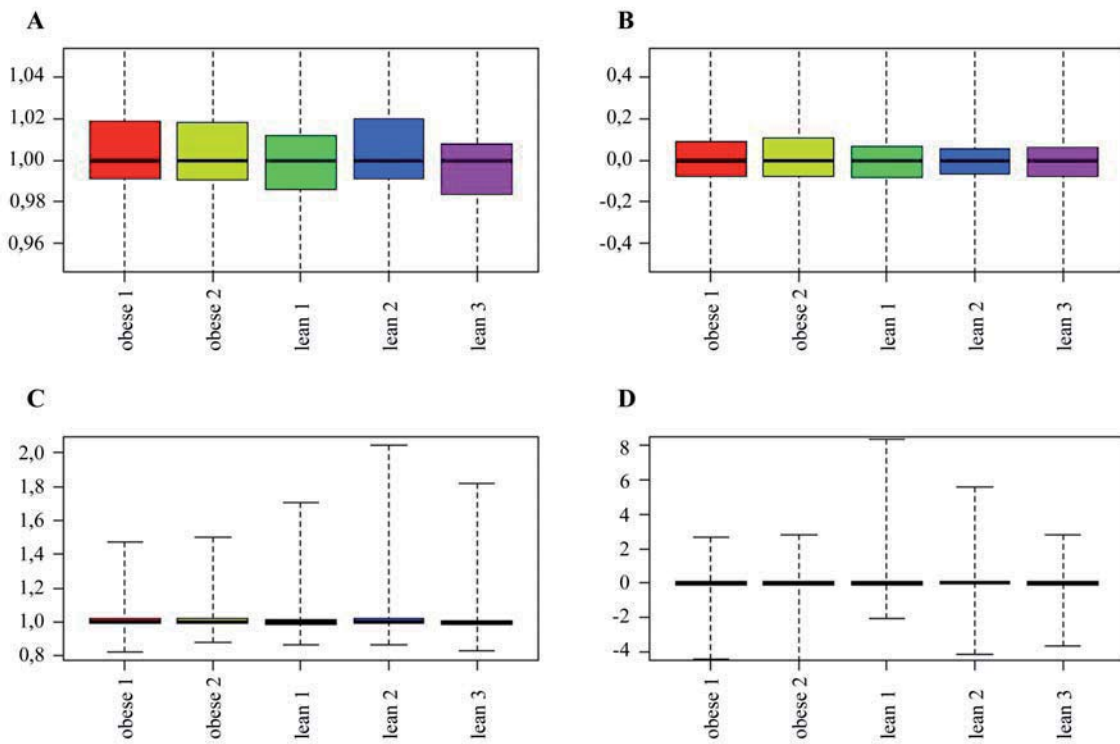
#### **ST 3. Bibliographic references for implication in proliferation processes of selected genes.**

From the list of all the genes modified in pMES adipose tissue by 30 days of cafeteria diet we chose those genes that codify for secreted proteins and were implicated in proliferation processes. Here we indicate the bibliographic references where the effects of these genes on proliferation are described.

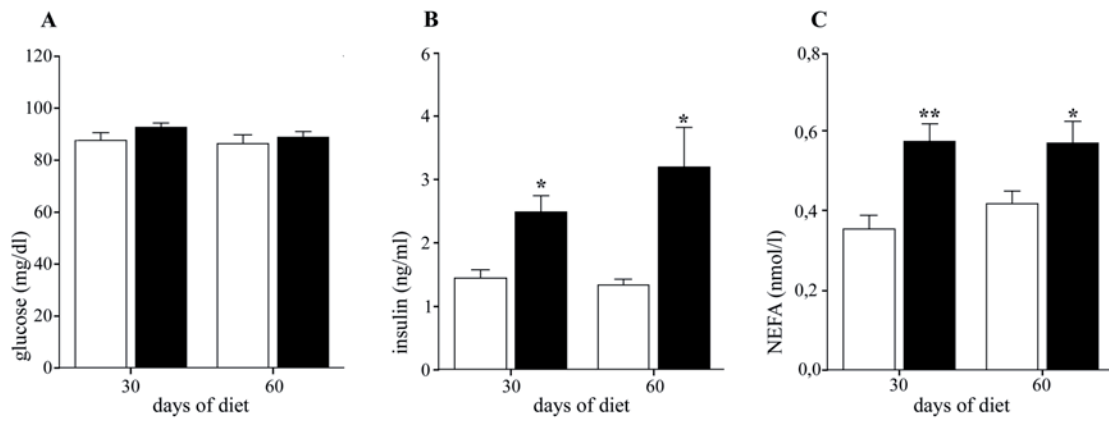
**SUPPLEMENTARY FIGURE 1**



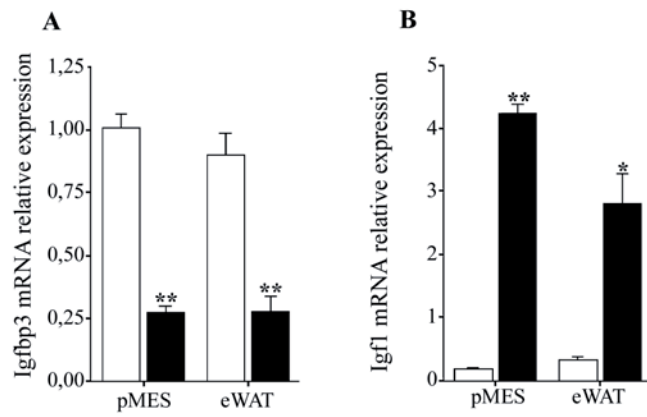
**SUPPLEMENTARY FIGURE 2**



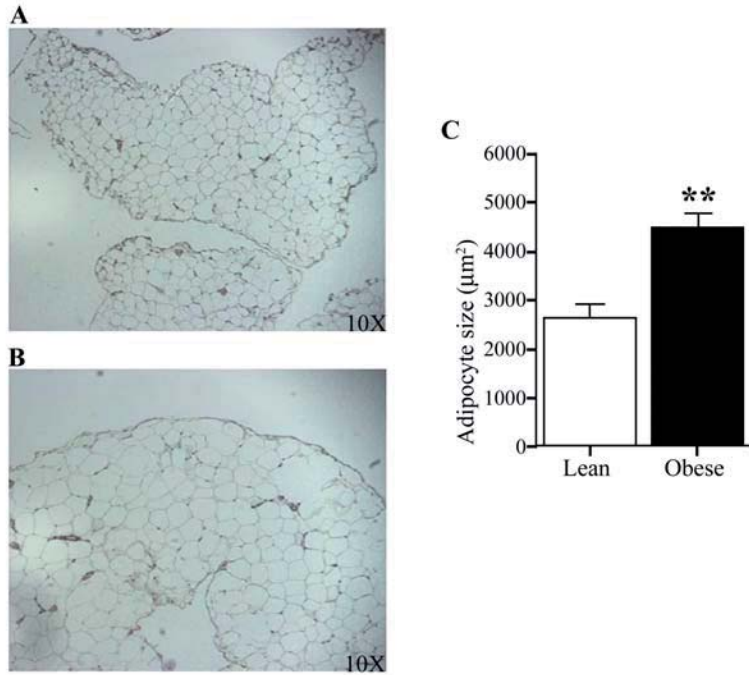
**SUPPLEMENTARY FIGURE 3**



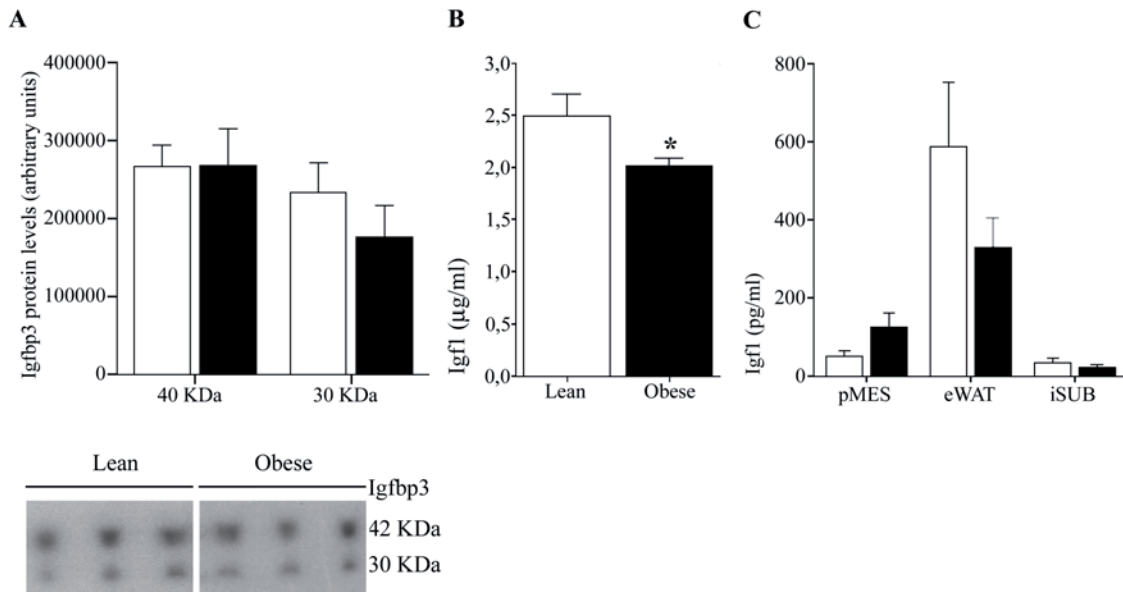
**SUPPLEMENTARY FIGURE 4**



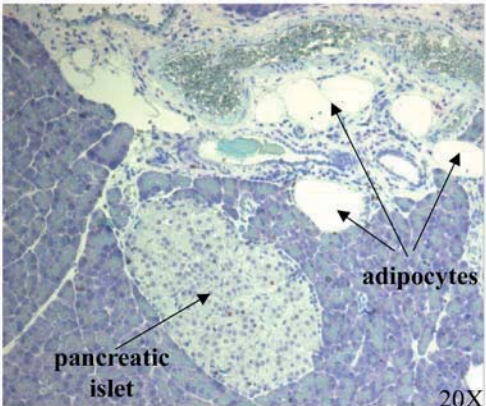
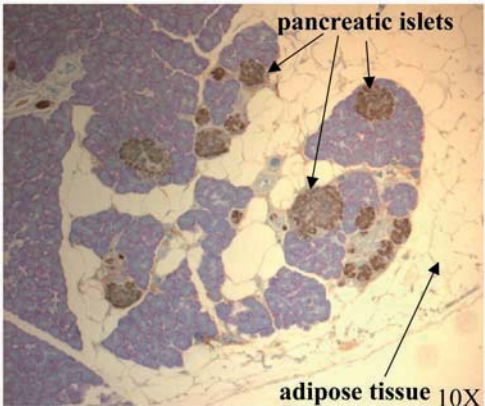
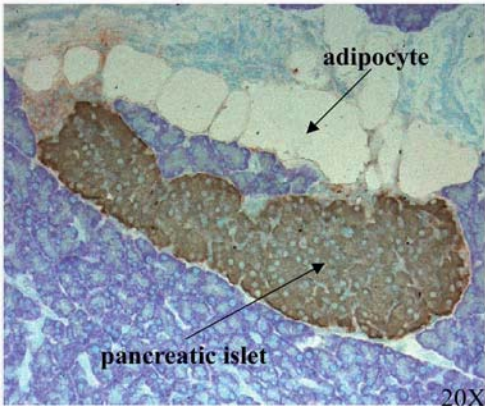
**SUPPLEMENTARY FIGURE 5**



**SUPPLEMENTARY FIGURE 6**



SUPPLEMENTARY FIGURE 7



**SUPPLEMENTARY TABLE 1**

<b>Gene Name</b>	<b>Representative Public ID</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<i>Cgref1</i>	U66470	aatgtggttgaggctcatagca	gggcatgagcctgtgtgtct
<i>Clu</i>	AF314657	cctgcgccaggagctaaac	ggaatgaagcagctcgttgact
<i>Egfl7</i>	AF223678	atggtggcgtgtgcatgtat	tccaatatagccaatgacacagttg
<i>Fgf18</i>	NM_019199	aactacacggcctgatgtca	gccgccccttcttggg
<i>Gdf10</i>	NM_024375	gacagccaggctgagaccaa	ctaccacgacgcggaagaa
<i>Ghbp</i>	AI170771	aacgtttcctcagatggacaca	gtgggtgctgggaattgaac
<i>Ghr</i>	AI170771	tattttcaaagcagcaaagg	attgtagaagtcgggtttgt
<i>Ghrtr</i>	AI170771	tattttcaagcagcaaagt	attgtagaagtcgggtttgt
<i>Igf1</i>	M15481	ccgctgcaagcctacaaagt	tgagtcttgggcatgtcagtgt
<i>Igfbp3</i>	AI713966	tgctgggagtgtggaaagc	gagtggatggaacttggaatcag
<i>Lep</i>	NM_013076	atttcacacacgcagtcg	agcccaggaatgaagtccaa
<i>Ptn</i>	NM_017066	cacaatgccgactgtcagaaa	cttgaggcttgggcttggg
<i>Sfrp4</i>	AF140346	aagccacccttacaggataaggt	ggcctaaggcaagtgggtgtgt
<i>Tbp</i>	AI535480	gacatcacctgcagca	gcagtgccgcccgaagta

**SUPPLEMENTARY TABLE 2**

Probe set	Gene Symbol	Gene Title	Representative Public ID	FC
1398276_at	<i>Dlg2</i>	discs, large homolog 2 (Drosophila)	NM_022282	4,75
1371076_at	<i>Cyp2b1</i> /// <i>Cyp2b.15</i> /// <i>Cyp2b2</i> /// <i>LOC685222</i> /// <i>LOC687222</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 1 /// cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 15 /// cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 2 /// similar to Cytochrome P450 2B12 (CYP11B12) /// similar to Cytochrome P450 2B12 (CYP11B12)	A1454613	3,99
1371293_at	<i>LOC688228</i>	similar to Myosin light polypeptide 4 (Myosin light chain 1, atrial isoform)	A1103218	3,86
1386936_at	<i>Grifin</i>	galactin-related inter-fiber protein	NM_057187	3,55
1367660_at	<i>Fabp3</i>	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	NM_024162	3,25
1387958_at	<i>Akr1c18</i>	aldo-keto reductase family 1, member C18	L32601	3,20
1387748_at	<i>Lep</i>	leptin	NM_013076	3,01
1371895_at	<i>Krt14</i>	keratin 14	B1279646	2,98
1370026_at	<i>Cryab</i>	crystallin, alpha B	NM_012935	2,71
1370568_at	<i>Adra2c</i>	adrenergic receptor, alpha 2c	M58316	2,50
1390421_at	<i>RGDI310475</i>	Similar to RIKEN cDNA 0610010D20	A1232524	2,39
1375303_at	<i>Ldb3</i>	LIM domain binding 3	B1294983	2,27

1384147_at	<i>Ejfl1a</i>	eukaryotic translation initiation factor 1A	AA955540	2,24
1387985_a_at	<i>Obp3</i>	alpha-2u globulin PGCL4	AB039825	2,23
1368618_at	<i>Grb14</i>	growth factor receptor bound protein 14	NM_031623	2,20
1373436_at	<i>RGDI306739</i>	similar to RIKEN cDNA 1700040L02	A1171288	2,19
1383624_at	<i>RGDI565033</i>	similar to hypothetical protein LOC284018 isoform b	BF420279	2,15
1370106_at	<i>Fgf18</i>	fibroblast growth factor 18	NM_019199	2,09
1377163_at	<i>Inhbb</i>	Inhibin beta-B	BM385741	2,05
1389809_at	<i>Pmepal</i>	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	A1410144	1,97
1369680_at	<i>Slc2a13</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13	NM_133611	1,96
1388689_at	<i>LOC682245</i>	similar to Acylphosphatase, muscle type isozyme (Acylphosphate phosphohydrolase)	A1170755	1,92
1368109_at	<i>St3gal5</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	NM_031337	1,92
1376799_a_at	<i>Crif1</i>	cytokine receptor-like factor 1	AA925924	1,88
1392265_s_at	<i>Mmp23</i>	matrix metalloproteinase 23	A1548892	1,88
1367908_at	<i>Gesh</i>	glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)	NM_133598	1,87
1384367_at	<i>RGDI563516</i>	similar to histone protein Hist2h3c1	A1715140	1,86



1382265_at	<i>Gcap14</i>	granule cell antiserum positive 14	A1070061	1,85
1389783_s_at	<i>RGDI311906</i>	similar to Fc fragment of IgG binding protein; IgG Fc binding protein	B1280865	1,85
1373960_at	<i>Tmem120a</i>	transmembrane protein 120A	A1235631	1,83
1367734_at	<i>Akr1b1</i>	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	NM_012498	1,83
1372485_at	<i>Pcbd1</i>	pterin 4 alpha carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 1	BF281220	1,78
1381012_at	<i>Serpinf1</i>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1	B1303349	1,77
1393621_at	<i>Vkorc111</i>	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1-like 1	AA956405	1,77
1373674_at	<i>Mfap5</i>	microfibrillar associated protein 5	B1283094	1,75
1395146_at	<i>Adipor2</i>	adiponectin receptor 2	B1290608	1,75
1369674_at	<i>P2rx5</i>	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	X92069	1,74
1376500_at	<i>Fbxo23</i>	F-box only protein 23	A1639044	1,74
1376977_at	<i>Ptger3</i>	Prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	A1411541	1,73
1398612_at	<i>Akr1c12</i>	aldo-keto reductase family 1, member C12	BM383010	1,71
1373590_at	<i>Stom</i>	stomatin	B1295949	1,70
1373657_at	<i>Slc31a2</i>	solute carrier family 31, member 2	BF417391	1,70

1380956_at	<i>LOC367597</i>	Similar to nidogen 2	BG672418	1,69
1371883_at	<i>Mmd</i>	monocyte to macrophage differentiation-associated	BG376037	1,67
1375971_at	<i>Chn5</i>	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5	BM386028	1,65
1368394_at	<i>Sfrp4</i>	secreted frizzled-related protein 4	AF140346	1,64
1372476_at	<i>Fads3</i>	fatty acid desaturase 3	AW533321	1,64
1368095_at	<i>Ak3</i>	adenylate kinase 3	NM_013218	1,64
1392856_at	<i>Serf1</i>	small EDRK-rich factor 1	A1549470	1,62
1395519_at	<i>MGC95152</i>	similar to B230212L03Rik protein	BG670960	1,62
1398262_at	<i>Prps2</i>	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	NM_012634	1,61
1368387_at	<i>Bdh1</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	NM_053995	1,61
1370361_at	<i>Cgref1</i>	cell growth regulator with EF hand domain 1	U66470	1,61
1382376_at	<i>Bag4</i>	BCL2-associated athanogene 4	B1297220	1,60
1392563_at	<i>Prr5</i>	proline rich 5 (renal)	AW252517	1,59
1369336_at	<i>Hr</i>	hairless	NM_024364	1,59
1368486_at	<i>Irs3</i>	insulin receptor substrate 3	NM_032074	1,59

1369581_at	<i>Pemt</i>		phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	NM_013003	1,59
1393191_at	<i>RGDI561205</i>		similar to RIKEN cDNA 2610200G18	BF554733	1,57
1374635_at	<i>LOC689663</i>		Hypothetical protein LOC689663	AW527151	1,56
1373803_a_at	<i>Ghr</i>		growth hormone receptor	AII170771	1,54
1395765_at	<i>RGDI307396</i>		similar to RIKEN cDNA 6330406115	BF546899	1,54
1388463_at	<i>Tex264</i>		testis expressed gene 264	AW252660	1,54
1373620_at	<i>Nus1</i>		nuclear undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 homolog (S. cerevisiae)	AII102038	1,53
1368165_at	<i>Prps1</i>		phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	NM_017243	1,53
1374582_at	<i>Kctd9</i>		potassium channel tetramerisation domain containing 9	AII175423	1,52
1374947_at	<i>Bcar3</i>		breast cancer anti-estrogen resistance 3	BI286041	1,52
1387271_at	<i>Phyh</i>		phytanoyl-CoA hydroxylase	NM_053674	1,50
1377205_at	<i>RGDI308759</i>		similar to KIAA0892 protein	BE107410	-1,51
1368851_at	<i>Ets1</i>		v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	NM_012555	-1,51
1374626_at	<i>Lrg1</i>		leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	BG371585	-1,51
1391456_at	<i>Jam3</i>		junctional adhesion molecule 3	AA998207	-1,51

1391430_at	<i>Cyb5r2</i>	cytochrome b5 reductase 2	BE105855	-1,51
1368297_at	<i>Gata2</i>	GATA binding protein 2	NM_033442	-1,52
1369083_at	<i>Cirbp</i>	cold inducible RNA binding protein	NM_031147	-1,52
1377159_at	<i>Tsc22d4</i>	TSC22 domain family, member 4	BE120729	-1,52
1389351_at	<i>Lrrfip1</i>	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	BM387864	-1,54
1398354_at	<i>Cttnm1</i>	catenin (cadherin associated protein), alpha-like 1	A1555457	-1,54
1388940_at	<i>Arhgap25</i>	Rho GTPase activating protein 25	AW252115	-1,54
1368073_at	<i>Irf1</i>	interferon regulatory factor 1	NM_012591	-1,54
1391925_at	<i>Ccl19</i>	chemokine (C-C motif) ligand 19	AA996885	-1,54
1372691_at	<i>Upp1</i>	uridine phosphorylase 1	BI292558	-1,56
1393460_at	<i>Lrrc33</i>	leucine rich repeat containing 33	BM388665	-1,56
1370097_a_at	<i>Cxcr4</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	U54791	-1,56
1394022_at	<i>Id4</i>	inhibitor of DNA binding 4	BE116009	-1,56
1370402_at	<i>Egfl7</i>	EGF-like domain 7	AF223678	-1,57
1369968_at	<i>Ptn</i>	pleiotrophin	NM_017066	-1,58

1370905_at	<i>Dock9</i>	dedicator of cytokinesis 9	BI291229	-1,58
1384939_at	<i>Il18r1</i>	interleukin 18 receptor 1	BF522954	-1,61
1386956_at	<i>Scarb1</i>	scavenger receptor class B, member 1	NM_031541	-1,61
1368227_at	<i>Slc28a2</i>	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	NM_031664	-1,62
1387547_a_at	<i>Eltf1</i>	EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1	NM_022294	-1,63
1397439_at	<i>LOC497978</i>	similar to diacylglycerol kinase epsilon	AI101639	-1,66
1379703_at	<i>Demnd3</i>	DENN/MADD domain containing 3	BF288207	-1,66
1367784_a_at	<i>Clu</i>	clusterin	AF314657	-1,67
1370383_s_at	<i>RT1-Db1</i>	RT1 class II, locus Db1	BI279526	-1,67
1396163_at	<i>Igtp</i>	interferon gamma induced GTPase	BF563316	-1,67
1386080_at	<i>Hey1</i>	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	BE107815	-1,67
1370987_at	<i>Spn</i>	sialophorin	BF550890	-1,68
1392990_at	<i>Sox17</i>	SRY-box containing gene 17	AI031004	-1,70
1369146_a_at	<i>Ahr</i>	aryl hydrocarbon receptor	AF082125	-1,70
1390114_at	<i>Mpz11</i>	myelin protein zero-like 1	BM384017	-1,71

1380668_at	<i>MGC72974</i>	Hypothetical LOC316976	BI275851	-1,72
1382778_at	<i>Dusp6</i>	Dual specificity phosphatase 6	A1231350	-1,72
1392259_at	<i>Hectd1</i>	HECT domain containing 1	A1574925	-1,73
1368512_a_at	<i>Enpep</i>	glutamyl aminopeptidase	AF214568	-1,76
1383075_at	<i>Ccnd1</i>	cyclin D1	BI295861	-1,77
1368514_at	<i>Maob</i>	monoamine oxidase B	NM_013198	-1,83
1383679_at	<i>Rnf31</i>	ring finger protein 31	BF411972	-1,84
1369720_at	<i>Myo1b</i>	myosin Ib	NM_053986	-1,85
1373992_at	<i>MGC108823</i>	similar to interferon-inducible GTPase	A1408440	-1,91
1383938_at	<i>Ncoa7</i>	nuclear receptor coactivator 7	BI286738	-1,92
1369625_at	<i>Aqp1</i>	aquaporin 1	AA891661	-1,92
1368911_at	<i>Kcnj8</i>	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	AB043636	-1,93
1389092_at	<i>Il2rg</i>	interleukin 2 receptor, gamma chain	A1178808	-1,99
1387189_at	<i>Slc22a3</i>	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 3	NM_019230	-2,04
1394681_at	<i>Akr1c11</i>	aldo-keto reductase family 1, member C-like 1	AW522526	-2,13

1369691_at	<i>Scn3a</i>	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	NM_013119	-2,22
1380063_at	<i>Ch25h</i>	cholesterol 25-hydroxylase	AI169398	-2,43
1367786_at	<i>Psm8</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	NM_080767	-2,43
1369664_at	<i>Avpr1a</i>	arginine vasopressin receptor 1A	NM_053019	-2,50
1367652_at	<i>Igf3</i>	insulin-like growth factor binding protein 3	AI713966	-2,59
1368459_at	<i>Gdf10</i>	growth differentiation factor 10	NM_024375	-2,62
1370822_at	<i>RT1-Ba</i>	RT1 class II, locus Ba	AF307302	-2,64
1387073_at	<i>Snap25</i>	synaptosomal-associated protein 25	NM_030991	-2,74
1387134_at	<i>Slf3</i>	schlafen 3	NM_053687	-2,75
1387053_at	<i>Fmo1</i>	flavin containing monooxygenase 1	NM_012792	-2,89
1368420_at	<i>Cp</i>	ceruloplasmin	NM_012532	-2,94
1393347_at	<i>Igal</i>	integrin alpha L	BI289767	-3,03
1385682_at	<i>Vit</i>	vitrin	BI300559	-3,14
1387157_at	<i>Pmfbp1</i>	polyamine modulated factor 1 binding protein 1	NM_134393	-3,20
1370429_at	<i>RT1-Aw2</i>	RT1 class Ib, locus Aw2	L40362	-3,24

1387319_at	<i>Ccl11</i>	chemokine (C-C motif) ligand 11	NM_019205	-3,96
1368610_at	<i>Mca32</i>	mast cell antigen 32	NM_021585	-4,21
1389734_x_at	<i>RT1-149</i>	RT1-149 protein	BI282965	-5,50
1371262_at	<i>IgG-2a</i> /// <i>Igha_mapped</i> /// <i>LOC678701</i>	gamma-2a immunoglobulin heavy chain /// immunoglobulin heavy chain (alpha polypeptide) (mapped) /// hypothetical protein LOC678701	AJ391299	-6,15
1371065_at	<i>LOC688090</i> /// <i>RT1-Bb</i>	similar to RT1 class II histocompatibility antigen, B-1 beta chain precursor (RT1.B-beta(1)) /// RT1 class II, locus Bb	BM389513	-17,49



## SUPPLEMENTARY TABLE 3

### Leptin (*Lep*)

**Garofalo C, Surmacz E** 2006 Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 207:12-22

**Islam MS, Morton NM, Hansson A, Emilsson V** 1997 Rat insulinoma-derived pancreatic beta-cells express a functional leptin receptor that mediates a proliferative response. *Biochem Biophys Res Commun* 238:851-5

**Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y** 1997 Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 241:765-8

### Fibroblast growth factor 18 (*Fgf18*)

**Haque T, Nakada S, Hamdy RC** 2007 A review of FGF18: Its expression, signaling pathways and possible functions during embryogenesis and post-natal development. *Histol Histopathol* 22:97-105

**Hu MC, Qiu WR, Wang YP, Hill D, Ring BD, Scully S, Bolon B, DeRose M, Luethy R, Simonet WS, Arakawa T, Danilenko DM** 1998 FGF-18, a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation. *Mol Cell Biol* 18:6063-74

### Secreted frizzled-related protein 4 (*Sfrp4*)

**Kawano Y, Kypta R** 2003 Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116:2627-34

**Welters HJ, Kulkarni RN** 2008 Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 19:349-55

**Schinner S, Willenberg HS, Schott M, Scherbaum WA** 2009 Pathophysiological aspects of Wnt-signaling in endocrine disease. *Eur J Endocrinol* 160:731-7

### Cell growth regulator with EF hand domain 1 (*Cgref1*)

**Madden SL, Galella EA, Riley D, Bertelsen AH, Beaudry GA** 1996 Induction of cell growth regulatory genes by p53. *Cancer Res* 56:5384-90

### Growth hormone receptor (*Ghr*)

**Edens A, Talamantes F** 1998 Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr Rev* 19:559-82

**Clark RG, Mortensen DL, Carlsson LM, Spencer SA, McKay P, Mulkerrin M, Moore J, Cunningham BC** 1996 Recombinant human growth hormone (GH)-binding protein enhances the growth-promoting activity of human GH in the rat. *Endocrinology* 137:4308-15

**Mannor DA, Winer LM, Shaw MA, Baumann G** 1991 Plasma growth hormone (GH)-binding proteins: effect on GH binding to receptors and GH action. *J Clin Endocrinol Metab* 73:30-4

**Liu JL, Coschigano KT, Robertson K, Lipsett M, Guo Y, Kopchick JJ, Kumar U, Liu YL** 2004 Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E405-13

**Parsons JA, Bartke A, Sorenson RL** 1995 Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* 136:2013-21

#### **EGF-like domain 7 (*Egfl7*)**

**Parker LH, Schmidt M, Jin SW, Gray AM, Beis D, Pham T, Frantz G, Palmieri S, Hillan K, Stainier DY, De Sauvage FJ, Ye W** 2004 The endothelial-cell-derived secreted factor *Egfl7* regulates vascular tube formation. *Nature* 428:754-8

**Schmidt MH, Bicker F, Nikolic I, Meister J, Babuke T, Picuric S, Muller-Esterl W, Plate KH, Dikic I** 2009 Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) modulates Notch signalling and affects neural stem cell renewal. *Nat Cell Biol* 11:873-80

#### **Pleiotrophin (*Ptn*)**

**Perez-Pinera P, Berenson JR, Deuel TF** 2008 Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 15:210-4

**Chauhan AK, Li YS, Deuel TF** 1993 Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:679-82

**Fang W, Hartmann N, Chow DT, Riegel AT, Wellstein A** 1992 Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J Biol Chem* 267:25889-97

#### **Clusterin (*Clu*)**

**Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, Reichrath J** 2006 Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 13:12-9

**Kim BM, Han YM, Shin YJ, Min BH, Park IS** 2001 Clusterin expression during regeneration of pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 44:2192-202

**Kim SY, Lee S, Min BH, Park IS** 2007 Functional association of the morphogenic factors with the clusterin for the pancreatic beta-cell differentiation. *Diabetes Res Clin Pract* 77 Suppl 1:S122-6

**Min BH, Kim BM, Lee SH, Kang SW, Bendayan M, Park IS** 2003 Clusterin expression in the early process of pancreas regeneration in the pancreatectomized rat. *J Histochem Cytochem* 51:1355-65

#### **Insulin-like growth factor binding protein 3 (*Igfbp3*)**

**Yamada PM, Lee KW** 2009 Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C954-7

**Chen X, Ferry RJ, Jr.** 2006 Novel actions of IGFBP-3 on intracellular signaling pathways of insulin-secreting cells. *Growth Horm IGF Res* 16:41-8

**Shim ML, Levitt Katz LE, Davis J, Dotzler WC, Cohen P, Ferry RJ, Jr.** 2004 Insulin-like growth factor binding protein-3 is a novel mediator of apoptosis in insulin-secreting cells. *Growth Horm IGF Res* 14:216-25

**Growth differentiation factor 10 (*Gdf10*)**

**Dai Z, Lakshmanan RR, Zhu WG, Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Brena RM, Li B, Wright FA, Ross P, Otterson GA, Plass C** 2001 Global methylation profiling of lung cancer identifies novel methylated genes. *Neoplasia* 3:314-23

**Dai Z, Popkie AP, Zhu WG, Timmers CD, Raval A, Tannehill-Gregg S, Morrison CD, Auer H, Kratzke RA, Niehans G, Amatschek S, Sommergruber W, Leone GW, Rosol T, Otterson GA, Plass C** 2004 Bone morphogenetic protein 3B silencing in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 23:3521-9