Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

PAPER DE L'AMINO-OXIDASA SENSIBLE A SEMICARBAZIDA, SSAO/VAP-1, DEL TEIXIT ADIPÓS EN LA DIABETIS *MELLITUS*

ANNA ABELLA MARTÍ
Barcelona, 2003

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOQUÍMICA, BIENNI 1998-2000, DEL DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA

MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTORA EN BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Presentada per:

ANNA ABELLA MARTÍ

Vist i plau dels directors:

La interessada,

Dr. Antonio Zorzano Olarte
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

Anna Abella Martí

Dr. Luc Marti
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

Als meus pares

ÍNDEX

ÍNDEX 1

I. INTRODUCCIÓ 9

1. Fisiologia de l'adipòcit 11

1.1. Acció de la insulina sobre el metabolisme de l'adipòcit 13

1.1.1. Els transportadors de glucosa: GLUT 14

1.1.2. Via clàssica d'estimulació del transport de glucosa per la insulina 15

- IRS 16

- PI3K 17

- PDK-1 i PKB 17

- p70 S6 quinasa i mTOR 18

- PKC ?/? 19

- Proteïnes fosfotirosina-fosfatasa (PTP) 19

1.1.3. Via d'estimulació de la insulina independent de la PI3K 19

1.1.4. El peròxid d'hidrogen com a missatger secundari 20

1.2. L'adipòcit com a cèl·lula endocrina 21

1.2.1. Leptina 22

1.2.2. TNF? 23

1.2.3. Adiponectina 24

1.2.4. Resistina 25

1.2.5. Àcids grassos lliures o no esterificats (FFA o NEFA) 26

1.2.5. Altres adipocitocines i variacions globals 28

1.3. Efectes insulinomimètics del vanadat 29

2. Amino-oxidasa sensible a semicarbazida: SSAO 31

2.1. Propietats de les amino-oxidases 31

2.1.1. Les amino-oxidases en les diferents espècies 32

2.1.2. Estructura de les SSAO 37

2.1.3. Localització tissular de l'SSAO 40

2.1.4. Reacció enzimàtica 41

2.2. Implicacions fisiològiques de l'SSAO 42

2.2.1. Paper de l'SSAO com a proteïna d'adhesió 42

2.2.1.1. Fisiologia de la funció d'adhesió de l'SSAO 43

2.2.1.2. Funció d'adhesió i activitat enzimàtica 45

2.2.2. SSAO i teixit adipós: efectes insulinomimètics 47

2.2.2.1. Expressió d'SSAO a la cèl·lula adiposa 47

2.2.2.2. SSAO i transport de glucosa en adipòcits 48

2.2.2.3. SSAO i diferenciació adipocitària 49

2.2.3. SSAO en altres tipus cel·lulars 49

2.3. Implicacions patològiques de l'SSAO 50

2.3.1. Efectes de l'SSAO sobre el teixit vascular 50

2.3.2. SSAO i creixement cel·lular 52

II. OBJECTIUS 53

III. MATERIALS I MÈTODES 57

1. Animals 59
1.1. Grups experimentals 59
1.1.1. Animals controls no diabètics 59
1.1.2. Model animal de diabetis *mellitus* de tipus 1 59
1.1.3. Model animal de diabetis *mellitus* de tipus 2 59
1.1.4. Animals amb l'activitat SSAO inhibida 60
1.2. Estudis amb animals 60
1.2.1. Administració aguda de benzilamina i vanadat a rates *Wistar* 60
1.2.2. Test de tolerància a la glucosa (TTG) 61
1.2.3. Tractaments crònics de rates diabètiques 64
1.2.4. Ablació del teixit adipòs 65
1.2.5. Explants humans 66
1.2.6. Mètodes analítics 67
- Determinació de la glucèmia i la glucosúria 67
- Determinació de la concentració d'insulina 68
- Determinació de triglicèrids 68
- Determinació d'àcids grassos lliures o no esterificats 69
2. Estudis amb teixits de rata 70
2.1. Teixit adipós blanc 70
2.1.1. Aïllament d'adipòcits de rata 70
2.1.2. Incubació *in vitro* d'adipòcits aïllats 72
2.1.3. Mesura del transport de glucosa 73
2.1.4. Quantificació de lípids 75
2.1.5. Obtenció d'homogenats i membranes totals a partir d'adipòcits aïllats 76
2.1.6. Obtenció de làmines de membrana plasmàtica 77
2.2. Múscul 79
2.2.1. Aïllament 79
2.2.2. Assaig del transport de glucosa 80
2.2.3. Transport de múscul *ex vivo* 83
2.3. Pàncrees 83
2.3.1. Obtenció d'illots pancreàtics 84
2.3.2. Secreció d'insulina 86
2.3.3. Extractes d'illots pancreàtics 88
2.4. Obtenció d'homogenats i de membranes totals a partir de teixit 89
3. Estudis amb cèl·lules en cultiu 90
3.1. Tècniques generals de cultiu cel·lular 90
3.1.3. Medis de cultiu 91

3.1.2. Protocol de divisió o subcultiu 92
3.1.3. Protocol de descongelació 93
3.1.4. Protocol de congelació 93
3.1.5. Detecció de micoplasma 94
3.2. Diferenciació de les cèl·lules 3T3-L1 94
3.3. Obtenció de membranes totals de fibroblasts i adipòcits 3T3-L1 94
3.4. Recol·lecció i concentració de medis de cultiu 95
3.5. Tractaments amb sialidasa i N-glicosidasa 97
4. Valoració de la concentració de proteïnes 98
4.1. Mètode de Bradford 98
4.2. Mètode BCA 98
5. Mesura de l'activitat amino-oxidasa 99
5.1. Assaig radiomètric 100
5.2. Assaig espectrofotomètric 103
6. Estudis de l'estat de fosforilació de les proteïnes dels adipòcits 105
6.1. Activitat proteïna tirosina-fosfatasa 106
6.2. Perfil de fosforilació en tirosines 108
6.3. Immunoprecipitació de proteïnes fosforilades en tirosina amb un anticòs monoclonal específic 108
6.4. Activitat proteïna-quinasa B (PKB) 111
7. Immunolocalització per a microscòpia òptica 113
8. Assaig per transferència *Western blot* 114
8.1. Electroforesi en SDS-PAGE 115
8.2. Electrotransferència 118
8.3. Assaig d'immunotransferència o immunodetecció 119
8.4. Reutilització de membranes d'immobilon en assajos de transferència *Western blot*: *stripping* de membranes 120
9. Preparació i manipulació de DNA i RNA 122
9.1. Aïllament d'RNA total: aïllament per Cscl 122
9.2. Electroforesi en gel d'agarosa/formaldehid 124
9.3. Síntesi de cDNA: RT-PCR 126
9.4. PCR 127
9.5. Electroforesi en gel d'agarosa 128
9.6. Seqüenciació del producte de PCR 130
9.7. PCR en temps real 131
10. Ressonància magnètica nuclear: RMN 136
Apèndix I: solucions d'ús general 137
Apèndix II: anticossos usats per transferència *Western blot* 141
II.1. Anticossos primaris 141
II.2. Anticossos secundaris 142

II.3. Percentatge d'acrilaminda del gel, solucions de bloqueig i rentat i dilucions per a cada anticòs 143

IV. RESULTATS 145

1. Efectes de l'administració combinada de benzilamina i vanadat *in vivo* sobre les concentracions plasmàtiques de glucosa i insulina en rates i estudis complementaris sobre la via de senyalització activada 147
   1.1. Efectes dels substrats de l'SSAO sobre el transport de glucosa i la translocació de GLUT4 159
   1.2. Els substrats de l'SSAO activen vies de senyalització semblants a les activades per la insulina en cèl·lules adiposes 159
   1.3. La combinació de benzilamina i vanadat administrada *in vivo* disminueix les concentracions de glucosa en sang 161
2. Efectes de la combinació de benzilamina i vanadat sobre el metabolisme glucídic en rates diabètiques per estreptozotocina 163
   2.1. Test de tolerància a la glucosa en rates no diabètiques i en rates diabètiques per estreptozotocina (STZ) 173
   2.2. Tractament crònic amb benzilamina i vanadat de rates diabètiques per estreptozotocina 178
   2.3. Metabolisme glucídic en els teixits perifèrics de rates diabètiques per estreptozotocina després del tractament crònic amb benzilamina i vanadat 181
3. Efectes de la combinació de benzilamina i vanadat sobre el metabolisme de la glucosa en rates diabètiques Goto-Kakizaki 187
   3.1. Test de tolerància a la glucosa en rates diabètiques Goto-Kakizaki 199
   3.2. Tractament crònic amb benzilamina i vanadat de rates diabètiques Goto-Kakizaki 202
   3.3. Metabolisme glucídic en els teixits perifèrics després del tractament crònic amb benzilamina i vanadat 203
   3.4. Efectes de la benzilamina i el vanadat sobre el metabolisme muscular i l'expressió d'adipocitocines 208
   3.5. Implicació de les proteïna tirosina-fosfatasa i producció de peroxovanadat en la via estimulada per benzilamina i vanadat 212
4. Els adipòcits alliberen una forma soluble d'SSAO/VAP-1 217
   4.1. Les cèl·lules adiposes alliberen la forma soluble d'SSAO/VAP-1 per un mecanisme de *shedding* 231
   4.2. L'alliberament de l'SSAO pels adipòcits és un procés regulat per diferents factors 234

V. DISCUSSIÓ 239

1. Mecanismes de senyalització implicats en l'acció de la benzilamina i del vanadat en els adipòcits 241
2. Efectes *in vivo* de l'administració de benzilamina i vanadat 243

2.1. Efectes sobre el metabolisme glucídic 243
2.2. Efectes del tractament crònic amb benzilamina i vanadat sobre els teixits perifèrics 244
2.2.1. Efectes del tractament crònic sobre teixit adipós 244
2.2.2. Efectes del tractament crònic sobre múscul 247
2.2.3. Efectes del tractament crònic en cèl·lules ? 249
2.3. Model dels efectes cel·lulars de l'SSAO/VAP-1 en l'homeòstasi glucídica 249
2.3.1. Avantatges de la producció *in situ* de peroxovanadat per l'SSAO 251
2.3.2. Importància de les proteïnes tirosina-fosfatasa 255
3. L'adipòcit com a font d'SSAO/VAP-1 256
4. Visió global de l'administració de substrats de l'SSAO 261
VI. CONCLUSIONS 263
VII. ABREVIATURES 267
VIII. REFERÈNCIES 273
IX. ENGLISH SUMMARY 307
X. ANNEX 365

I. INTRODUCCIÓ

1. FISIOLOGIA DE L'ADIPÒCIT

Els lípids emmagatzemats al teixit adipós blanc (TAB) són la major reserva energètica dels vertebrats. El TAB està compost per adipòcits madurs que representen entre 1/3 i 2/3 de la totalitat de les cèl·lules i per una mescla de cèl·lules de l'estroma vascular que inclou cèl·lules sanguínies, cèl·lules endotelials i cèl·lules precursores d'adipòcits (preadipòcits). El teixit adipós es desenvolupa a diferents llocs de l'organisme, tant subcutàniament (TAB subcutani) com al voltant de diferents òrgans (TAB visceral). El seu desenvolupament comença durant l'embriogènesi però el procés continua durant tota la vida i consta de dos fenòmens: augment de la mida de les cèl·lules (hipertròfia) i augment del nombre de cèl·lules (hiperplàsia).

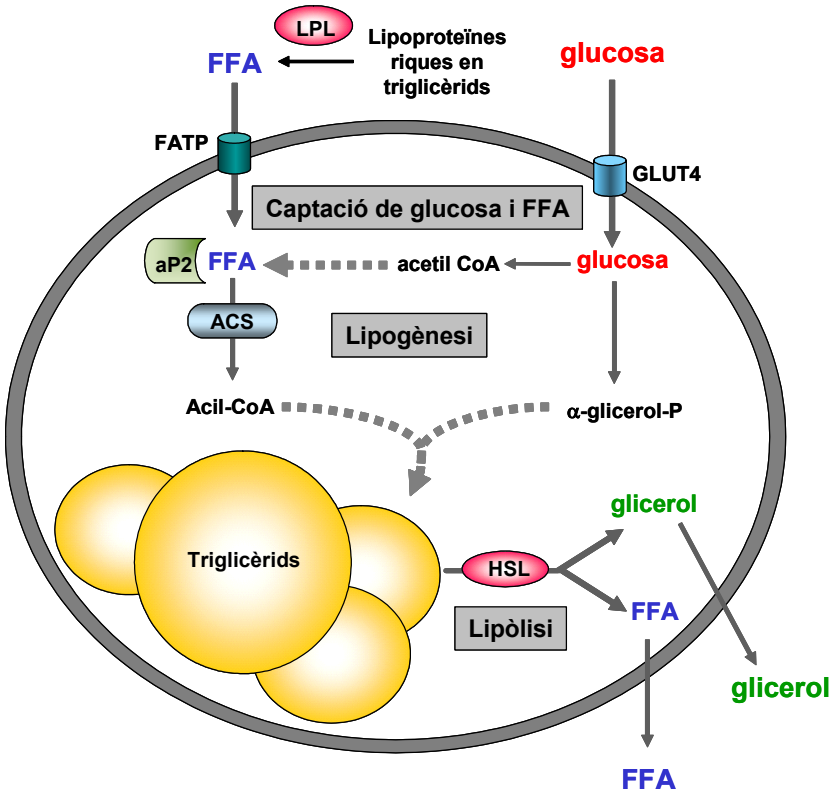


Figura 1. Vies bioquímiques implicades en la regulació del balanç energètic en l'adipòcit. FFA, àcids grassos lliures; FATP, proteïna transportadora d'àcids grassos; aP2, proteïna adipocitària lligand d'àcids grassos; ACS, acil-CoA sintasa; HSL, lipasa sensible a hormones; LPL, lipoproteïna-lipasa; GLUT4, transportador de glucosa sensible a insulina. Com a proteïna transportadora d'àcids grassos a la figura només s'indica la FATP tot i que a l'adipòcit n'hi ha d'altres que contribueixen en aquest procés. (Adaptat de Sethi and Hotamisligil, 1999).

La funció principal del teixit adipós és el control de les reserves energètiques de l'organisme que conté emmagatzemades en forma de triacilglicèrids. Durant períodes d'excés calòric el teixit adipós emmagatzema els lípids i els sucres que hi ha en excés (lipogènesi) i durant estats de necessitat energètica allibera les reserves en forma d'àcids grassos lliures o no esterificats (FFA o NEFA) i glicerol (lipòlisi) (figura 1). Aquests processos responen a estímuls exteriors com per exemple la insulina, el cortisol, les catecolamines, l'hormona de creixement, la testosterona, els FFA i diferents citocines. El teixit adipós és també un òrgan

endocrí ja que contribueix en els processos d'homeòstasi glucídica i sensibilitat a la insulina mitjançant l'alliberament d'adipocitocines.

Actualment, la falta d'aliments ha desaparegut a les societats desenvolupades. La seva abundància i l'increment del sedentarisme provoca una excessiva acumulació de teixit adipós que condueix a l'obesitat. Així, l'obesitat és una acumulació excessiva d'energia en forma de greix deguda a una descompensació del balanç energètic, és a dir, entre l'energia ingerida i la gastada.

L'obesitat es defineix mèdicament com un estat de pes corporal excessiu, més específicament de teixit adipós, de suficient magnitud per causar problemes de salut. L'indicador més universalment acceptat per definir el grau d'obesitat és el BMI (*Body Mass Index*) o índex de massa corporal. Aquest indicador té en compte l'alçada i el pes i es defineix com a BMI = p/a^2 on p és el pes en quilograms i a és l'alçada en metres. Un BMI entre 20-25 es considera normal, un BMI entre 25-30 es considera sobrepès, un BMI entre 30-35 defineix l'obesitat i davant un BMI > 35 es parla d'obesitat mòrbida.

En els últims temps hi ha hagut un increment alarmant en el nombre d'individus obesos a les societats occidentals (Kuczmarski *et al.*, 1994). Prop d'un 30% de la població dels Estats Units és obesa. La prevalença d'obesitat entre els nens s'ha incrementat notablement; aquest fet fa presagiar un problema mèdic de primera magnitud a les properes dècades (Troiano and Flegal, 1999).

Juntament amb l'obesitat, i donada la resistència a la insulina que aquesta porta associada, apareixen altres malalties com ara la hipertensió, la hiperlipèmia, l'arteriosclerosi i la diabetis *mellitus* de tipus 2. Paradoxalment, la inexistència de teixit adipós també porta associada insulinoresistència i diabetis (Moitra *et al.*, 1998; Shimomura *et al.*, 1998).

La diabetis es defineix com un estat en el qual el metabolisme de lípids i carbohidrats no està ben ajustat per la insulina. Aquest fet condueix a uns nivells anormalment elevats de glucosa en sèrum durant el dejuni que, en condicions normals, es mouen en una estreta franja al voltant d'una concentració de 105 mg/dl. Quan la concentració de glucosa se situa entre 110-140 mg/dl es parla d'intolerància a la glucosa o IGT (*Impaired Glucose Tolerance*). Quan les concentracions de glucosa en sèrum en dejuni estan per sobre de 140 mg/dl es parla de diabetis. De diabetis n'hi ha fonamentalment de dos tipus: la diabetis de tipus 1 o insulinodependent (IDDM) és una malaltia autoimmune que representa entre el 5% i el 10% dels casos totals de diabetis. La diabetis de tipus 2 o no dependent d'insulina (NIDDM) representa la majoria de casos de diabetis i té com a principal característica la resistència a la insulina. Existeixen també altres tipus de diabetis, com la de tipus MODY (*Maturity-Onset Diabetis of the Youth*) o la diabetis gestacional.

L'any 1998 es va estimar que 143 milions de persones al món patien diabetis, i que aquest nombre probablement es duplicaria al cap de trenta anys (Harris *et al.*, 1998). Tot i que la diabetis és una malaltia amb més prevalença a les societats industrialitzades, cada cop està més clar que els països en desenvolupament suportaran el gruix de l'epidèmia en el futur. En pacients amb diabetis el risc de patir infart es multiplica per un factor que oscil·la entre 2 i 4, dependent d'altres factors de risc, com ara l'obesitat. La diabetis és la primera causa de malaltia renal, ceguesa i amputació d'extremitats.

La relació entre l'obesitat i la diabetis de tipus 2 està molt establerta, i sovint tots dos grups se solapen, de manera que un 70% dels diabètics de tipus 2 són obesos. Hi ha una sòlida correlació entre la quantitat de greix intraabdominal i la sensibilitat a la insulina (Banerji *et al.*, 1995) i importants evidències suporten la idea que l'acumulació de greix, especialment l'abdominal, predisposa a la diabetis. L'alliberament excessiu d'àcids grassos no esterificats (NEFA) a la sang provoca resistència a la insulina en teixits perifèrics i impedeix la correcta secreció d'insulina al pàncrees. Igualment, altres molècules secretades pel teixit adipós tenen un paper important en el desenvolupament de la diabetis.

1.1. ACCIÓ DE LA INSULINA SOBRE EL METABOLISME DE L'ADIPÒCIT

La insulina és l'hormona anabòlica més potent coneguda en mamífers. Realitza funcions pleotròpiques essencials per al creixement, per al desenvolupament dels teixits i per al manteniment del metabolisme intermediari i regula la concentració de glucosa en la sang. Les cèl·lules β del pàncrees secreten insulina a la circulació com a resposta a l'augment de la concentració dels nivells circulants de glucosa i aminoàcids. La insulina estimula la captació de glucosa pel teixit adipós i pel múscul i inhibeix la producció de glucosa pel fetge (gluconeogènesi i glicogenòlisi). A la diabetis de tipus 2, el teixit adipós i el múscul no poden captar glucosa en presència d'insulina i aquesta és incapaç de suprimir l'alliberament de glucosa pel fetge; aquest fenomen es coneix com a resistència a la insulina.

Pel que fa al teixit adipós, la insulina estimula l'emmagatzemament de triglicèrids per diferents vies (figura 2): *a*) promovent la diferenciació de preadipòcits a adipòcits, *b*) estimulant el transport de glucosa, la captació d'àcids grassos i la síntesi de triglicèrids (lipogènesi) i *c*) inhibint la lipòlisi. A les properes seccions s'analitzaran els efectes de la insulina sobre el teixit adipós centrant-se en el transport de glucosa.

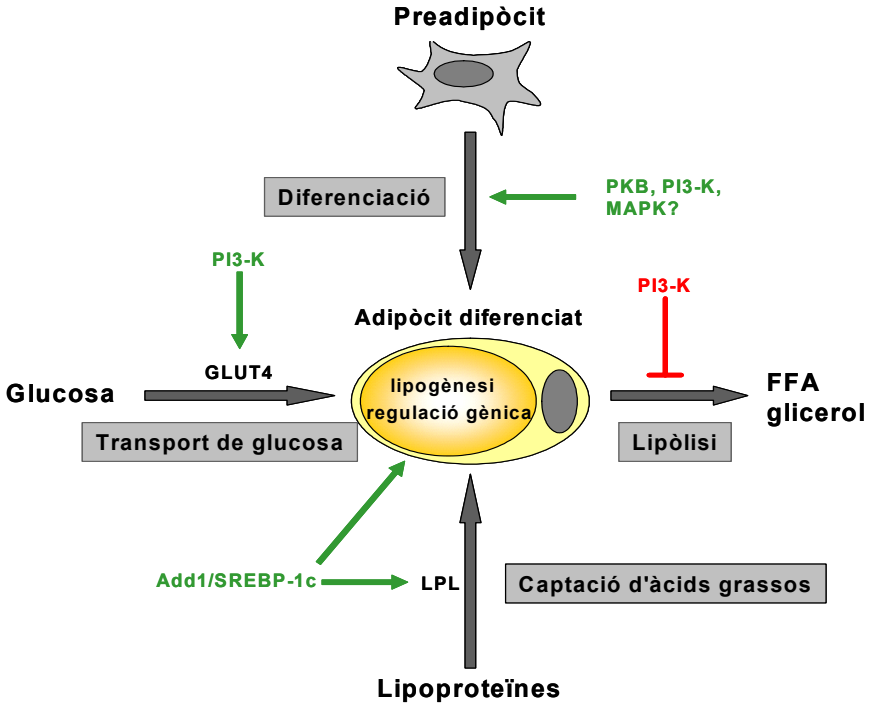


Figura 2. Accions pleotròpiques de la insulina a l'adipòcit. LPL, lipoproteïna-lipasa; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinasa, MAPK, proteïna-quinasa activada per mitògens. En verd s'indiquen les vies activades i en vermell, les inhibides.

1.1.1. ELS TRANSPORTADORS DE GLUCOSA: GLUT

El transport de glucosa està mediat per la família de transportadors facilitats de glucosa GLUT. Es tracta d'una família de 13 proteïnes, cadascuna de les quals presenta una distribució tissular i propietats cinètiques específiques. Els transportadors més ben caracteritzats són els de la classe I, GLUT1-4.

GLUT1 s'expressa de manera ubíqua i és el responsable del transport basal de glucosa. GLUT2 s'expressa a la cèl·lula β i al fetge, presenta una afinitat baixa i, juntament amb l'hexoquinasa, forma part del sistema sensor de glucosa en aquests teixits. GLUT3 és un transportador d'elevada afinitat i s'expressa durant el desenvolupament fetal i a les neurones adultes. GLUT4 s'expressa de manera restringida a les cèl·lules adiposes i musculars i és el responsable del transport de glucosa estimulat per insulina. GLUT4 es troba en situació basal en un compartiment intracel·lular i en presència d'insulina es transloca a la membrana plasmàtica (Slot *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991; Zorzano *et al.*, 1989). Aquesta translocació és el pas limitant per al transport de glucosa estimulat per insulina (Saltiel, 2001).

S'han fet diversos estudis per identificar el compartiment intracel·lular sensible a la insulina on es troba localitzat GLUT4. En estat basal GLUT4 es recicla contínuament i lenta

entre la membrana i el compartiment intracel·lular, entre el 2 i el 5% de la proteïna es troba a la membrana plasmàtica (Jhun *et al.*, 1992; Slot *et al.*, 1991; Yang and Holman, 1993). Després de l'estimulació amb insulina l'exocitosi de GLUT4 augmenta entre 10 i 20 vegades i l'endocitosi es redueix lleugerament (entre 2 i 3 vegades). Això comporta que el 50% de la proteïna es trobi localitzada a la membrana.

Existeixen diferents poblacions de vesícules intracel·lulars que contenen GLUT4 (Aledo *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1997; Sevilla *et al.*, 1997). El compartiment que es transloca en resposta a la insulina no és un compartiment endocític i no conté les proteïnes clàssiques que es reciclen a les cèl·lules (Martin *et al.*, 2000). Aquest compartiment consisteix en unes vesícules d'uns 50 nm de diàmetre que contenen proteïnes v-SNARE (VAMP2 i VAMP3) (Hashiramoto and James, 2000; Ramm *et al.*, 2000), que interaccionen amb les proteïnes de la membrana plasmàtica t-SNARE (sintaxina 4 i SNAP23) produint-se la fusió de les vesícules que contenen GLUT4 a la membrana de la cèl·lula (Pessin *et al.*, 1999). No està clar si aquestes proteïnes estan sota el control directe de la via de senyalització de la insulina.

La translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica és un procés que s'inicia amb la interacció de la insulina amb el seu receptor a la membrana de la cèl·lula. Aquesta interacció provoca l'activació de l'activitat quinasa del receptor la qual inicia la via de senyalització intracel·lular que es detalla a continuació.

1.1.2. VIA CLÀSSICA D'ESTIMULACIÓ DEL TRANSPORT DE GLUCOSA PER LA INSULINA

El receptor de la insulina (IR) és una proteïna heterodimèrica de membrana formada per dues subunitats α i dues subunitats β. Quan la insulina s'uneix a la subunitat α del receptor s'activa l'activitat quinasa intrínseca de la subunitat β i es produeix una autofosforilació creuada de les dues subunitats β. La família de proteïnes substrat del receptor de la insulina (IRS) interacciona amb l'IR fosforilat a través d'un domini d'unió a fosfotirosines (PTB) de manera que es fosforilen diverses tirosines de l'IRS (revisat a Sesti *et al.*, 2001). A les tirosines fosforilades de l'IRS s'hi uneixen proteïnes amb dominis SH2 com la p85. P85 és el domini regulador de la proteïna fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), formada pel dímer de la subunitat reguladora p85 i la subunitat catalítica p110 (Gupta *et al.*, 1999). En condicions basals la PI3K es troba al citosol, en presència d'insulina quan el domini p85 s'uneix a IRS el domini catalític p110 s'acosta a la membrana plasmàtica i fosforila el fosfatidilinositol, el fosfatidilinositol-4-fosfat o el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat de manera que es formen els derivats fosforilats en la posició 3 de l'anell d'inositol. Entre aquests, el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PI3P) activa proteïnes amb dominis pleckstrina com la PDK-1 (proteïna-quinasa dependent de 3-fosfoinositol) i la PKB o Akt (proteïna-quinasa B) (revisat a Rameh and Cantley, 1999). PDK-1 fosforila a la vegada PKB i PKC ξ/λ (isoformes de la proteïna-quinasa C atípiques). El paper d'aquesta via en la

translocació de GLUT4 ha estat demostrat amb l'ús d'inhibidors de la PI3K com la wortmanina i LY294002 els quals, a part d'impedir la translocació de GLUT4, també impedeixen el transport de glucosa (Cheatham *et al.*, 1994; Haruta *et al.*, 1995; Okada *et al.*, 1994) (figura 3).

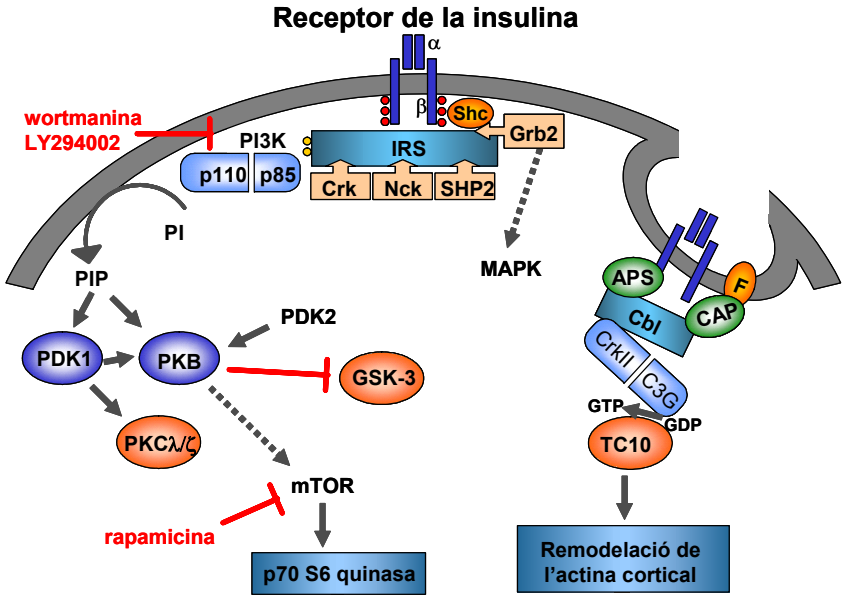


Figura 3. Les vies de senyalització de la insulina. Les línies vermelles indiquen inhibicions. Les fletxes discontínues indiquen vies on intervenen diverses proteïnes, algunes d'elles encara no han estat identificades. PI indica el fosfatidilinositol fosforilat per la PI3K ja sigui el fosfatidilinositol, el fosfatidilinositol-4-fosfat o el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat. PIP indica el derivat fosforilat en la posició 3 de l'anell d'inositol de qualsevol d'aquests substrats. (Adaptat Khan and Pessin, 2002; Taha and Klip, 1999).

A continuació es detallen les característiques principals dels membres d'aquesta via i les activacions paral·leles que se'n deriven.

- IRS

Es coneixen diversos membres de la família IRS. IRS-1 i IRS-2 s'expressen a gran quantitat de teixits, IRS-3 s'expressa només al teixit adipós, el fibroblast i els hepatòcits (Lavan *et al.*, 1997) i IRS-4 només s'expressa a les cèl·lules embrionàries de ronyó en cultiu (Lavan *et al.*, 1997).

A les tirosines fosforilades pel receptor de la insulina s'hi uneixen, a part de p85, altres proteïnes de senyalització amb dominis SH2 com ara la proteïna tirosina-fosfatasa SHP-2, Grb2, Nck i Crk. A més a més, els IRS competeixen amb el producte del gen Shc per la unió a l'IR (Gustafson *et al.*, 1995). La proteïna Grb2, que es pot unir als dominis SH2 dels IRS o de Shc, forma part de la via d'estimulació de la MAPK. Encara que la MAPK està caracteritzada en la via de la insulina, aquesta sembla que no està implicada en el procés metabòlic de transport de glucosa activat per la insulina, sinó que principalment està implicada en processos de mitogènesi i proliferació cel·lular.

- PI3K

La PI3K posseeix dos tipus d'activitat quinasa, l'activitat quinasa de lípids que dóna com a producte majoritari PI3P i l'activitat serina-quinasa que autofosforila les subunitats p85 i p110 i inhibeix l'activitat lípid-quinasa (Carpenter *et al.*, 1993; Dhand *et al.*, 1994). Mentre que l'activitat lípid-quinasa s'activa per l'associació de p85 amb IRS, sembla que l'activitat proteïna-quinasa s'activa per la unió de la PI3K directament a l'IR (Rondinone *et al.*, 2000). Usant models de mutació de cadascuna de les activitats quinases sembla que l'activitat lípid-quinasa és la responsable de la fosforilació de PKB i PDK-1 mentre que l'activitat proteïna-quinasa és la responsable de l'activació de la via de la MAPK (Bondeva *et al.*, 1998).

A part de l'activació del transport de glucosa, altres efectes de la insulina passen per la PI3K. Així, aquesta activitat és necessària per a la inhibició de la lipòlisi, l'activació de la síntesi d'àcids grassos i de glicogen, el creixement cel·lular i la proliferació i l'expressió de gens implicats al metabolisme (revisat a Alessi and Downes, 1998).

- PDK-1 i PKB

PKB és una proteïna serina/treonina-quinasa amb tres isoformes diferents, α, β i γ. PKB α i β s'activen per l'acció de la insulina al teixit adipós i depenen de l'activitat PI3K (Burgering and Coffer, 1995). PKB s'activa per unió als productes de la PI3K fosfatidilinositol-3,4-bifosfat i fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (Klippel *et al.*, 1997) i per la fosforilació directa de la PDK1 a la treonina 308 (Alessi *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1998) i d'una altra proteïna encara no clonada anomenada PDK2 que fosforilaria la serina 473. La unió de PKB als productes de la PI3K té una doble acció sobre aquesta: d'una banda la transloca del citosol a la membrana acostant-la a PDK1 i 2 i d'una altra provoca un canvi conformacional que permet que la PDK1 la fosforili (revisat a Alessi and Cohen, 1998).

L'activació de PKB per la insulina provoca la translocació del GLUT4 (figura 4) i per tant, l'estimulació del transport de glucosa (Cong *et al.*, 1997; Tanti *et al.*, 1996); no es coneixen, però, les proteïnes que PKB fosforila i que porten a la translocació de GLUT4. L'activació de la PKB per la insulina provoca també la inactivació de la proteïna glicogen sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Cross *et al.*, 1995).

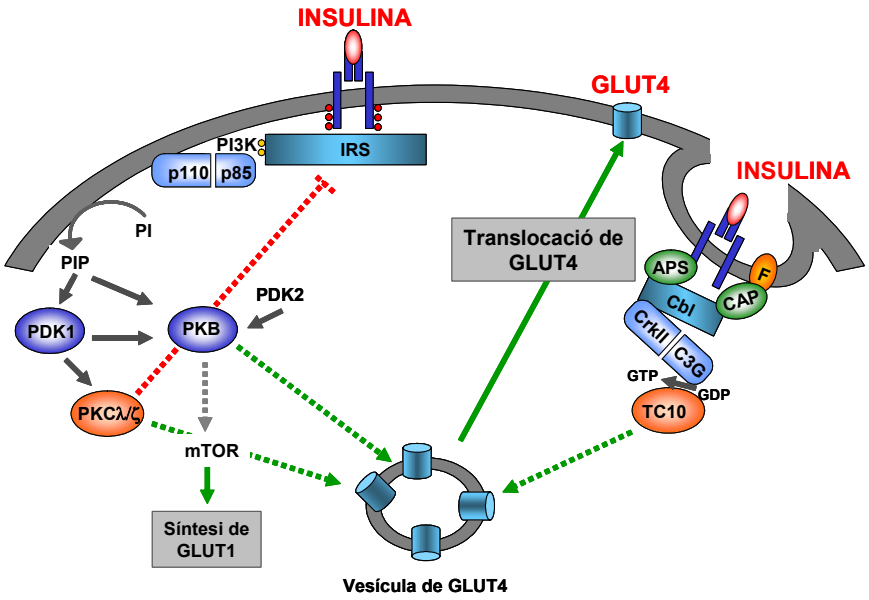


Figura 4. Acció de la insulina sobre els transportadors GLUT i el transport de glucosa. En verd s'indiquen les vies activades i en vermell les inhibides de les accions finals resultants de l'acció de la insulina sobre el transport de glucosa i els seus transportadors. Les fletxes discontinues indiquen vies on intervenen varies proteïnes. PI indica el fosfatidilinositol fosforilat per la PI3K ja sigui el fosfatidilinositol, el fosfatidilinositol-4-fosfat o el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat. PIP indica el derivat fosforilat en la posició 3 de l'anell d'inositol de qualsevol d'aquests substrats. (Adaptat de Khan and Pessin, 2002; Taha and Klip, 1999).

- p70 S6 quinasa i mTOR

La proteïna ribosomal p70 S6 quinasa és una altra proteïna serina/treonina-quinasa que es troba per sota de PKB en la via de senyalització de la insulina. Aquesta és responsable de la fosforilació de la proteïna ribosomal S6 que controla la traducció de diferents mRNA implicats en regulació de la mida cel·lular, el creixement i la proliferació. Per tal que aquesta proteïna s'activi cal que es fosforilin vuit llocs diferents (Pullen *et al.*, 1998): en aquesta fosforilació estan implicades tant la PKB com la PDK1 (Alessi and Cohen, 1998; Alessi *et al.*, 1998; Pullen *et al.*, 1998). Existeix també una via d'activació de p70 S6 quinasa independent de PI3K (Hara *et al.*, 1995; Somwar *et al.*, 1998). La rapamicina, un inhibidor de mTOR (proteïna de mamífers diana de la rapamicina), bloqueja l'activació de la p70 S6 quinasa (Scott *et al.*, 1998). mTOR podria ser fosforilada per la PKB (Scott *et al.*, 1998) i seria l'enllaç entre PKB i p70 S6 quinasa.

La proteïna p70 S6 quinasa sembla que no és necessària per al transport de glucosa estimulat per insulina ja que aquest és insensible a la rapamicina (Fingar *et al.*, 1993). La ruta mTOR/p70 S6 quinasa està implicada en la biosíntesi del transportador basal de glucosa GLUT1 (Taha *et al.*, 1999) (figura 4).

- PKC ξ/λ

Aquestes dues proteïnes PKC són activades en resposta a la insulina de manera dependent de PI3K i per una via que implica la PDK-1 (Bandyopadhyay *et al.*, 1999). Constitueixen una bifurcació en la via de senyalització de la insulina diferent de PKB-mTOR-p70 S6. No s'han trobat substrats de PKC ξ/λ implicats directament en la via estimulada per la insulina però s'ha proposat l'IRS-1 com a substrat de PKC ξ. La fosforilació en una serina d'IRS1 per PKC ξ disminueix la seva fosforilació en tirosines de manera que ja no s'activa la PI3K (Ravichandran *et al.*, 2001). Aquest resultat suggereix l'existència d'un mecanisme de retroalimentació negativa per regular la sensibilitat a la insulina a nivell d'IRS-1 (figura 4). D'altra banda, aquestes proteïnes també s'han implicat en la translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica (Bandyopadhyay *et al.*, 2001; Braiman *et al.*, 2001) i en el transport de glucosa estimulat per insulina en cèl·lules adiposes i musculars (Bandyopadhyay *et al.*, 2002; Standaert *et al.*, 2002), malgrat que alguns autors suggereixen que l'activació de les formes atípiques de la PKC *per se* no estimula el transport de glucosa (Egawa *et al.*, 2002).

- Proteïnes fosfotirosina-fosfatasa (PTP)

La senyalització de la insulina depèn tant de la fosforilació de certes proteïnes com de la desfosforilació d'altres. A més a més, el nivell de fosforilació de l'IR i de la resta de proteïnes de la via és el resultat d'un balanç entre l'activitat tirosina-quinasa de l'IR induïda per la insulina i l'activitat PTP de la cèl·lula. Les PTP es classifiquen segons el substrat que defosforilen com a proteïnes fosfotirosina-fosfatasa o com a proteïnes-fosfatasa amb activitat dual tant tirosina com serina/treonina-fosfatasa. En els teixits sensibles a la insulina les PTP actuen regulant negativament els senyals induïts per la insulina. PTP-1B, una proteïna tirosina-fosfatasa, és capaç de desfosforilar el receptor de la insulina i, per tant, disminuir el transport de glucosa (Tonks *et al.*, 1988). Així doncs, PTP-1B sembla un bon candidat per al tractament de la diabetis i l'obesitat fent-se interessant la cerca d'inhibidors específics d'aquesta proteïna. Entre els inhibidors de PTP que actualment es coneixen es troben el vanadat, el peroxovanadat i el peròxid d'hidrogen; tots tres han estat objecte d'estudi en aquesta tesi.

1.1.3. VIA D'ESTIMULACIÓ DE LA INSULINA INDEPENDENT DE LA PI3K

Tot i que la proteïna PI3K és necessària per al transport de glucosa estimulat per insulina, estudis recents indiquen l'existència en adipòcits d'una altra via que en presència d'insulina provoca la translocació de GLUT4 a la membrana i el transport de glucosa. En aquest sentit, s'ha observat que altres factors de creixement com el PDGF (factor de creixement derivat de plaquetes) estimulen PI3K sense causar la translocació de la glucosa (Summers *et al.*, 1999) i que la insulina és capaç d'estimular el transport de glucosa en cèl·lules on s'ha

sobreexpressat una forma permanentment activa de PI3K (Frevert and Kahn, 1997; Katagiri *et al.*, 1996).

Aquesta via alternativa sembla que s'origina a uns microdominis lipídics de la membrana anomenats *lipid rafts* i provoca l'activació d'una proteïna G petita, la TC10, implicada en la dinàmica de l'esquelet d'actina (Neudauer *et al.*, 1998).

Elements centrals de la via són les proteïnes Cbl i CAP, proteïna associada a Cbl, i APS, substrat associat a la proteïna (Moodie *et al.*, 1999; Ribon *et al.*, 1998) (figura 3). APS funciona com a adaptador perquè Cbl sigui fosforilat pel receptor de la insulina (Ahmed *et al.*, 2000). CAP permet l'atansament de Cbl a la membrana (Baumann *et al.*, 2000) ja que conté un domini d'homologia a la sorbina (SoHo) i dominis SH3 (homologia a Scr3). El primer permet la unió de CAP a la flotillina (F), un component dels *lipid rafts* (Bickel *et al.*, 1997), i els segons són els responsables de la interacció entre Cbl i CAP. Els residus de tirosina de la Cbl fosforilats pel receptor de la insulina són llocs d'unió per al complex CrkII/C3G (Tanaka *et al.*, 1994), sent CrkII un adaptador entre Cbl i C3G. C3G funciona com un factor intercanviador del nucleòtid GTP per a la proteïna TC10 (Baumann *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2001). TC10 té efectes sobre el manteniment de l'estructura d'actina, la qual cosa relaciona la dinàmica de l'actina i la translocació de GLUT4 (figura 4).

1.1.4. EL PERÒXID D'HIDROGEN COM A MISSATGER SECUNDARI

El H_2O_2 és una espècie reactiva d'oxigen, d'una banda, pot mimetitzar l'acció de la insulina i, d'una altra, actua com a missatger secundari (revisat a Finkel, 1998); en aquest sentit, està implicat en la transducció del senyal de la insulina.

Com a insulinomimètic, el peròxid d'hidrogen actua a les primeres etapes de la via de senyalització de la insulina, augmentant la fosforilació del receptor de la insulina i la seva activitat proteïna tirosina-quinasa (Hayes and Lockwood, 1987; Koshio *et al.*, 1988). Com que l'activació de l'activitat quinasa del receptor per la insulina augmenta la fosforilació en tirosines de proteïnes intracel·lulars, aquest pot ser el mecanisme pel qual el H_2O_2 realitza els seus efectes insulinomimètics. També s'ha demostrat que el H_2O_2 augmenta la fosforilació en tirosines de les proteïnes de la via de senyalització de la insulina mitjançant la inhibició de proteïnes tirosina-fosfatasa (PTP) (Heffetz *et al.*, 1992).

D'altra banda, en resposta a la insulina, la NADPH-oxidasa de la membrana plasmàtica genera H_2O_2 (Krieger-Brauer and Kather, 1992; Krieger-Brauer and Kather, 1995; Mukherjee and Lynn, 1977); el qual actua com un missatger secundari de l'acció de la insulina (Mukherjee, 1980). En aquest sentit, també s'ha descrit que el H_2O_2 que es produeix després de l'estimulació per la insulina inhibeix una proteïna tirosina-fosfatasa, la PTP-1B (Mahadev *et al.*,

2001), la qual cosa contribueix a desplaçar l'equilibri a favor de les proteïnes tirosina-quinasa.

Com a missatger secundari, el H_2O_2 també controla altres processos cel·lulars independents de l'acció de la insulina (revisat a Carlson and Sawada, 1995); així, el H_2O_2 regula la funció de factors de transcripció com l'NF-kB, l'activació de factors d'adhesió (Fraticelli *et al.*, 1996) i la fosforilació de proteïnes (Heffetz *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1995). En alguns casos, aquests processos poden desencadenar en apoptosi (Hansson *et al.*, 1996; Jacobson, 1996) o proliferació (Burdon, 1996).

Al sistema vascular, el H_2O_2 regula la proliferació i les propietats adhesives de les cel·lulars endotelials i les cèl·lules musculars llises (Johnston *et al.*, 1996); així, regula l'expressió de moltes molècules d'adhesió, incloent-hi les P-selectines (Cheng *et al.*, 1998) i les quimiocines (Saccani *et al.*, 2000), cosa que pot provocar un augment del reclutament de limfòcits als llocs d'inflamació (revisat a Kunsch and Medford, 1999). En aquest sentit, la incubació directa de cèl·lules endotelials amb altes concentracions de H_2O_2 augmenta l'adhesió de limfòcits, i l'administració exògena de H_2O_2 per via sistèmica augmenta el nombre d'aquests que roden sobre l'endoteli vascular (procés de *rolling*) (Johnston *et al.*, 1996).

1.2. L'ADIPÒCIT COM A CÈL·LULA ENDOCRINA

Fins fa pocs anys el teixit adipós estava considerat com un òrgan passiu en el control de l'homeòstasi energètica de l'organisme. Recentment s'ha vist que la seva funció endocrina és essencial per al control del balanç energètic ja que secreta diverses substàncies implicades en la sensibilitat perifèrica a la insulina. En aquest sentit, s'ha publicat que l'eliminació específica del transportador de glucosa GLUT4 en el teixit adipós de ratolins provoca resistència a la insulina en múscul esquelètic i fetge (Abel *et al.*, 2001), la qual cosa implica el teixit adipós en el control del metabolisme glucídic global de l'organisme.

A continuació es descriuen les principals adipocitocines secretades pel teixit adipós, les seves funcions endocrines (figura 5) i les seves alteracions en situacions d'insulinoresistència (figura 6).

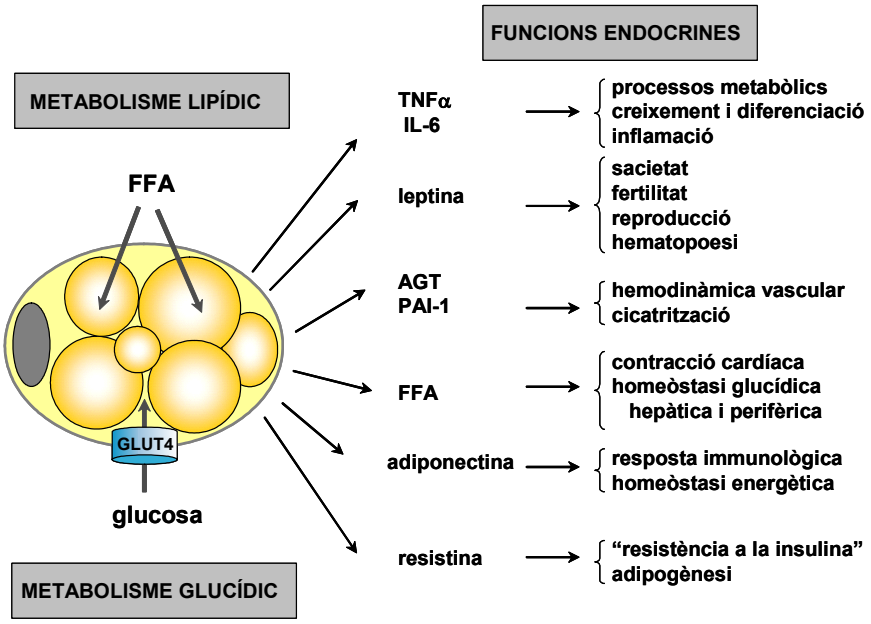


Figura 5. L'adipòcit com a cèl·lula endocrina. FFA, àcids grassos lliures; GLUT4, transportador de glucosa sensible a insulina; AGT, angiotensina; PAI-1 inhibidor de l'activador del plasminogen tipus 1, TNFα, factor de necrosi tumoral α; IL-6 interleucina-6. (Adaptat de Morrison and Farmer, 2000).

1.2.1. LEPTINA

La leptina regula la ingesta, el pes corporal, la despesa energètica i la funció neuroendocrina (Flier, 1998; Friedman and Halaas, 1998). Després de la ingesta d'aliment augmenten els nivells circulants de leptina per l'acció de la insulina sobre el teixit adipós (Saladin *et al.*, 1995); aquest senyal l'interpreten els receptors dels sistema nerviós central i es produeix la sensació de sacietat que provoca una disminució de la ingesta (Saladin *et al.*, 1995). La leptina també està implicada en la fertilitat, la reproducció i l'hematopoesi. Els glucocorticoides, la insulina, la infecció i les citocines de la inflamació l'augmenten i el fred, l'estimulació adrenèrgica, l'hormona tiroide i les tiazolidinediones redueixen la seva expressió.

Més recentment se l'ha implicat en fenòmens de modulació de la sensibilitat a la insulina. Els ratolins deficients en leptina (ratolins *ob/ob*) i els deficients en el receptor de la leptina (ratolins *db/db*) presenten resistència a la insulina. En el cas dels ratolins *ob/ob* aquesta es reverteix amb l'administració de leptina (Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995); aquest fet també s'observa en animals on hi ha resistència a la insulina associada a una manca de teixit adipós (Gavrilova *et al.*, 2000; Shimomura *et al.*, 1999). El grau de resistència a la insulina és superior a la que pot ser atribuïda a una hiperfàgia, la qual cosa evidencia que la leptina no tan sols actua al sistema central controlant la ingesta sinó que també pot tenir un paper directe en el metabolisme glucídic (Kahn and Flier, 2000). Així, l'administració de leptina en rates, a més d'augmentar la sensibilitat a la insulina,

augmenta la captació global de glucosa (Sivitz *et al.*, 1997) de manera independent de la ingesta (Halaas *et al.*, 1995; Shimomura *et al.*, 1999). D'altra banda, els nivells de leptina estan elevats en la resistència a la insulina associada a l'obesitat; aquest fet nega que la deficiència de leptina *per se* sigui la responsable de la resistència a la insulina i ha portat a postular que en aquests casos es produeix resistència a la leptina (Maffei *et al.*, 1995).

Hi ha receptors de la leptina al teixit adipós, el múscul esquelètic i el fetge. Aquestes observacions suggereixen efectes potencials de la leptina en els teixits diana de la insulina (Tartaglia, 1997). Alguns autors impliquen la leptina directament en la modulació de l'acció de la insulina als adipòcits (Kamohara *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 1997) i al múscul (Berti *et al.*, 1997; Kamohara *et al.*, 1997) però d'altres en neguen l'efecte directe sobre la captació perifèrica i la impliquen directament en la regulació dels fluxos de glucosa hepàtics (Liu *et al.*, 1998a). Als adipòcits, s'ha descrit una acció autocrina/paracrina de la leptina que provoca una inhibició de la lipogènesi i una estimulació de la lipòlisi (Fruhbeck *et al.*, 1998), al múscul esquelètic augmenta l'oxidació dels àcids grassos (Minokoshi *et al.*, 2002) i als hepatòcits, l'augment dels nivells de leptina podria antagonitzar els efectes de la insulina (Cohen *et al.*, 1996), ja que s'ha observat un augment en la gluconeogènesi (Rossetti *et al.*, 1997).

Com ja s'ha comentat, la insulina augmenta l'expressió de leptina als adipòcits i la secreció cap a la circulació (Saladin *et al.*, 1995); en el cas de rates diabètiques per estreptozotocina, on hi ha molt poc teixit adipós, s'ha observat uns nivells de leptina circulants disminuïts (MacDougald *et al.*, 1995). El tractament de pacients diabètics de tipus 1 o de tipus 2 amb insulina augmenta els nivells circulants de leptina (Nagasaka *et al.*, 1998; Widjaja *et al.*, 1997). A la vegada, la leptina redueix la secreció d'insulina al pàncrees produint-se una retroalimentació negativa de l'acció de la insulina (Cases *et al.*, 2001).

1.2.2. TNFα

El TNFα és una citocina proinflamatòria produïda pels macròfags i els limfòcits (Beutler and Cerami, 1988) i implicada en els processos d'inflamació crònica. El TNFα també és secretat pels adipòcits (Hotamisligil *et al.*, 1993) i s'ha implicat en processos de resistència a la insulina.

Els nivells de TNFα es correlacionen amb el nivell d'adiposita, estan elevats en models animals d'obesitat (Hotamisligil and Spiegelman, 1994). També s'observen augments de l'expressió de TNFα en estats d'hiperinsulinèmia (Hotamisligil *et al.*, 1995). Així, mentre que la disminució de l'expressió de TNFα provoca un augment de la sensibilitat a la insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993), l'administració continuada de TNFα provoca resistència a la insulina (Lang *et al.*, 1992). Animals *knock out* pel TNFα tenen nivells plasmàtics d'insulina més baixos, pesos més petits i millor tolerància a la glucosa (Ventre *et al.*, 1997) i estan protegits de

l'obesitat i la resistència a la insulina induïda per una dieta rica en greixos (Uysal *et al.*, 1997).

La resistència a la insulina induïda pel TNFα és conseqüència d'una inhibició de la fosforilació del receptor de la insulina (IR), una inactivació d'IRS-1, via la seva fosforilació en serines (Hotamisligil *et al.*, 1996), i una inhibició de la fosforilació de PI3K (Liu *et al.*, 1998b). Així mateix, TNFα disminueix l'expressió gènica del transportador de glucosa GLUT4 en miòcits (Hotamisligil and Spiegelman, 1994) i la de GLUT4, IRS-1 i el receptor de la insulina en adipòcits (Stephens *et al.*, 1997).

El TNFα augmenta la secreció de leptina (Zhang *et al.*, 2000). Tal com fa la leptina, produeix una acció paracrina al teixit adipós on provoca una inhibició de la lipogènesi, un augment de la lipòlisi, mort dels adipòcits via apoptosi i desdiferenciació adipocitària (Sethi and Hotamisligil, 1999). Aquests processos l'impliquen en la pèrdua de pes corporal i poden ser revertits per agents prodiferenciants com les tiazolidinediones que, a més a més, disminueixen l'expressió de TNFα (Peraldi *et al.*, 1997).

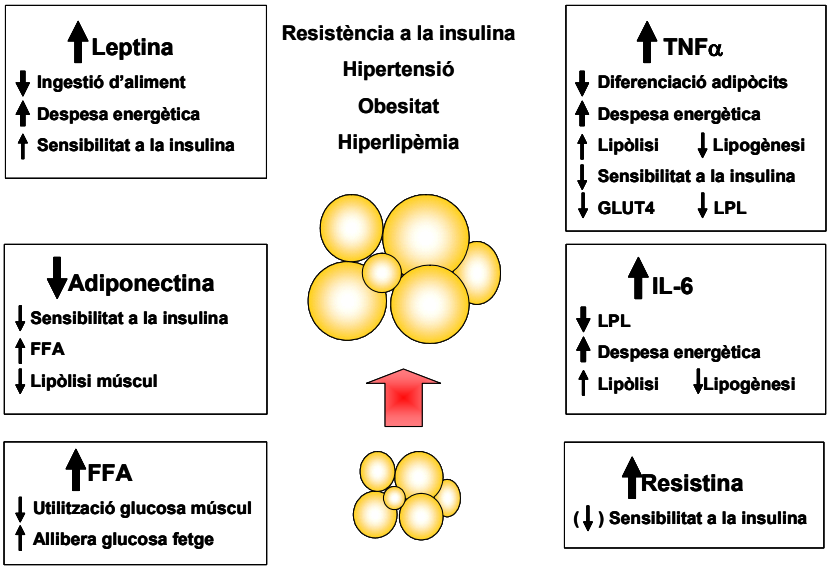


Figura 6. Alteracions de les adipocitocines en situacions d'insulinoresistència. (Adaptat de Fruhbeck *et al.*, 2001).

1.2.3. ADIPONECTINA

Aquesta proteïna de 30 kDa, també anomenada Acrp30 (*Adipocyte complement-related protein*) o adipoQ, es produeix únicament als adipòcits i se secreta al sèrum (Scherer *et al.*, 1995). La seva expressió s'indueix amb la diferenciació adipocitària i la seva secreció és estimulada per la insulina (Scherer *et al.*, 1995); anàlegs de l'AMPc, agonistes β-adrenèrgics, TNFα i glucocorticoides n'inhibeixen l'expressió. El seu receptor i la via estimulada no es coneixen.

Nivells baixos d'adiponectina en la circulació van associats a resistència a la insulina i a hiperinsulinèmia (Weyer *et al.*, 2001); així, en l'obesitat i en la diabetis de tipus 2 s'observen nivells plasmàtics d'adiponectina disminuïts (Arita *et al.*, 1999; Hotta *et al.*, 2000).

El tractament de ratolins *db/db* amb tiazolidinediones augmenta els nivells d'adiponectina circulants (Berg *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2001a) i en ratolins *ob/ob* l'administració d'adiponectina redueix la glucèmia (Berg *et al.*, 2001). En humans, l'administració d'adiponectina de manera aguda provoca una disminució en els nivells circulants d'FFA que s'assoleixen en estat postprandrial i l'administració crònica provoca una disminució del pes corporal sense afectar la ingesta (Fruebis *et al.*, 2001). La millora de la sensibilitat a la insulina observada després de l'administració d'adiponectina va acompanyada d'una disminució en el contingut de triglicèrids en múscul i fetge, d'un augment en l'oxidació d'àcids grassos (Fruebis *et al.*, 2001; Tomas *et al.*, 2002) i d'un augment de l'expressió de proteïnes implicades en el transport i la utilització d'àcids grassos al múscul (Yamauchi *et al.*, 2001a) i de la supressió de l'alliberament de glucosa que realitza la insulina en fetge (Berg *et al.*, 2001).

L'adiponectina actua inhibint la unió dels monòcits a les cèl·lules endotelials (Ouchi *et al.*, 1999). Aquesta interacció està relacionada amb dany vascular i arteriosclerosi, per la qual cosa pot desenvolupar un paper de protecció contra el dany vascular (Hotta *et al.*, 2000). Això suggereix que la disminució d'adiponectina en l'obesitat i la diabetis de tipus 2 contribueix als processos aterogènics associats a aquestes malalties.

1.2.4. RESISTINA

La resistina és una proteïna de 94 aminoàcids secretada a la circulació pels adipòcits en forma de dímer (Holcomb *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Steppan *et al.*, 2001) i que presenta una expressió induïda durant l'adipogènesi (Steppan *et al.*, 2001). La incubació d'adipòcits 3T3-L1 amb resistina provoca la inhibició de l'adipogènesi, de manera que podria tenir una funció paracrina sobre el teixit adipós regulant la diferenciació dels preadipòcits i com a mecanisme de retroalimentació en adipòcits diferenciats per reduir la formació de teixit adipós (Kim *et al.*, 2001).

Les primeres descripcions de resistina proposaren augments en el sèrum en l'obesitat; estudis posteriors han demostrat, en canvi, disminucions de la seva expressió. Així doncs, el seu paper en els fenòmens de resistència a la insulina no queda clar. A continuació es descriuen les observacions descrites a la literatura en tots dos sentits.

S'han observat augments de la forma circulant en models de diabetis i obesitat (Steppan *et al.*, 2001). L'administració d'anticossos antiresistina a ratolins obesos i insulinoresistents normalitza la glucèmia i millora la seva sensibilitat a la insulina. En models de ratolins resistents

a la insulina s'ha observat una correlació entre la reducció de l'expressió de resistina i l'augment en la sensibilitat insulínica (Yamauchi *et al.*, 2001b). S'ha descrit que el teixit adipós pot ser un teixit diana de l'acció de la resistina ja que el bloqueig de la seva secreció augmenta el transport de glucosa estimulat per insulina (Steppan *et al.*, 2001). Totes aquestes dades indiquen que augments de resistina contribueixen a la hiperglucèmia i a la resistència a la insulina.

En l'altre sentit, s'han observat reduccions de l'expressió de resistina en teixit adipós de ratolins obesos (*ob/ob* i *db/db* entre altres) (Hotta *et al.*, 2001; Way *et al.*, 2001) i en models de rata insulinoresistents (Juan *et al.*, 2001). Els FFA, la insulina (Haugen *et al.*, 2001) i el TNFα (Fasshauer *et al.*, 2001) inhibeixen l'expressió de resistina en adipòcits; els agonistes β-3-adrenèrgics, amb propietats antidiabètiques i antiobesitat, augmenten la seva expressió (Martinez *et al.*, 2001). Així doncs, aquestes dades i regulacions indiquen que en els estats de resistència a la insulina el nivell d'expressió de resistina disminueix.

En humans no s'han trobat evidències que relacionin la resistina amb la resistència a la insulina. A més a més, la seva expressió en teixit adipós i múscul és molt petita o inexistent (Nagaev and Smith, 2001). En aquest sentit, en adipòcits primaris en cultiu s'observa una major expressió de resistina en preadipòcits, la qual va disminuint amb la diferenciació (Janke *et al.*, 2002), i en adipòcits d'individus amb obesitat mòrbida s'observa un augment de la seva expressió (Savage *et al.*, 2001).

S'han descrit efectes de les tiazolidinediones (TZD) sobre l'expressió de la resistina. Els efectes de l'administració de TZD *in vivo* són controvertits, de manera que hi ha autors que descriuen un augment de l'expressió de la resistina després de la seva administració (Way *et al.*, 2001) i d'altres que en descriuen una reducció (Moore *et al.*, 2001; Steppan and Lazar, 2002). En humans els agonistes PPARγ no tenen efecte sobre l'expressió de la resistina (Savage *et al.*, 2001).

1.2.5. ÀCIDS GRASSOS LLIURES O NO ESTERIFICATS (FFA o NEFA)

L'augment excessiu d'FFA alliberats pel teixit adipós està implicat en estats de resistència a la insulina, com ara en l'obesitat i la diabetis de tipus 2 (Boden *et al.*, 1994; Reaven *et al.*, 1988). Els FFA competeixen amb la glucosa per l'oxigen i inhibeixen la captació global de glucosa a l'organisme a través del cicle de Randle (figura 7) (Coppack *et al.*, 1994).

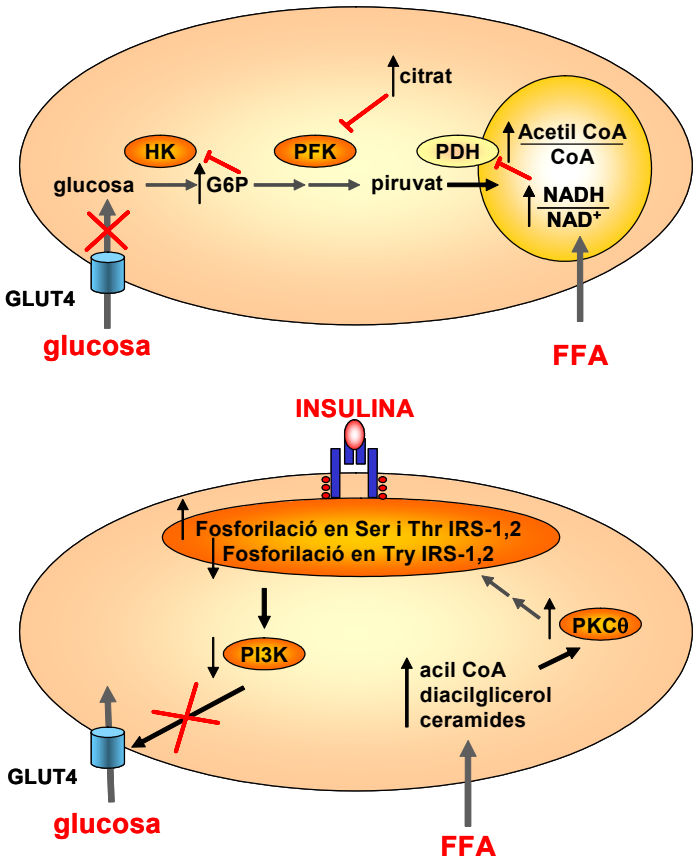


Figura 7. Mecanisme de la inducció de resistència a la insulina per àcids grassos lliures al múscul esquelètic: cicle de Randle. Un increment en els àcids grassos provoca un augment en les ràtios d'acetil CoA/CoA i de NADH/NAD^+ al mitocondri. Aquest increment provoca la inhibició de la piruvat-deshidrogenasa (PDH) de manera que augmenta la concentració de citrat al citoplasma. L'augment de citrat provoca la inhibició de la fosfofructoquinasa-1 (PFK) incrementant-se les concentracions de glucosa-6-fosfat (G6P) que inhibeixen l'hexoquinasa (HK). L'augment de les concentracions de glucosa intracel·lulars resultant provoca una disminució de la captació de glucosa pel múscul. Així mateix, l'augment dels derivats del metabolisme dels àcids grassos provoca una activació de la cascada de fosforilació en serines i treonines possiblement iniciada per PKCθ, que porta a la fosforilació d'aquests residus dels substrats del receptor de la insulina (IRS), disminuint-se l'activació de la proteïna fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) i la translocació de les vesícules de GLUT4 a la membrana, la qual cosa es tradueix també en una disminució de la captació de glucosa. (Adaptat de Shulman, 2000).

Els àcids grassos circulants fan disminuir la utilització de glucosa pel múscul (Roden *et al.*, 1996) interferint el senyal de la insulina mitjançant la inhibició de la fosforilació del seu receptor i de la unió d'IRS-1 (Dresner *et al.*, 1999), i disminuint la síntesi de glicogen i l'oxidació de glucosa (Petersen *et al.*, 1998). Al fetge, els NEFA poden estimular la gluconeogènesi incrementant l'expressió de la glucosa-6-fosfatasa (Rebrin *et al.*, 1996) de manera que augmenta l'alliberament hepàtic de glucosa (Reynisdottir *et al.*, 1994). Els àcids grassos també tenen efectes perjudicials sobre el teixit vascular; en aquest sentit, s'han implicat en la formació de la placa aterogènica (revisat a Pilgeram, 1993).

El paper dels àcids grassos en el metabolisme muscular i hepàtic pot explicar per què tant els estats d'obesitat com els de lipodistròfia presenten resistència a la insulina, ja que en ambdós casos està alterat el repartiment de greixos entre els adipòcits, el múscul i el fetge. L'acumulació de triglicèrids i els seus metabòlits en els teixits sensibles a la insulina provoca

insulinoresistència. Les tiazolidinediones (TDZ) promouen la diferenciació adipocitària i causen una redistribució del greixos del fetge i múscul al teixit adipós, en activar receptors PPARγ, de manera que aquests teixits recuperen la seva sensibilitat a la insulina (revisat a Shulman, 2000).

1.2.5. ALTRES ADIPOCITOCINES I VARIACIONS GLOBALS

L'IL-6 (interleucina-6) és una citocina que també secreta el teixit adipós (Fried *et al.*, 1998) i s'ha vist augmentada en l'obesitat (Mohamed-Ali *et al.*, 1999). S'ha observat una correlació entre els nivells d'IL-6 i resistència a la insulina (Bastard *et al.*, 2000). Degut que l'IL-6 augmenta la secreció hepàtica de triglicèrids (Fruhbeck *et al.*, 2001), es proposa que la resistència a la insulina observada ve donada per un augment dels nivells circulants d'FFA.

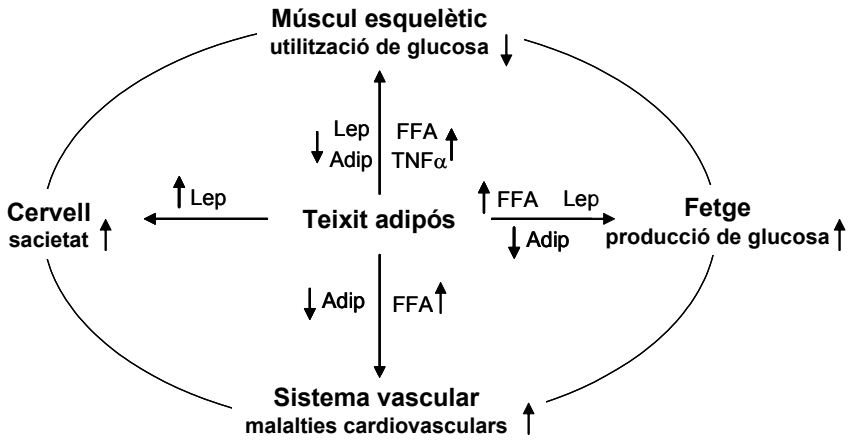


Figura 8. Paper del teixit adipós en l'obesitat i la resistència a la insulina.. Les hormones, citocines i àcids grassos lliures alliberats pel teixit adipós afecten altres teixits de l'organisme induint resistència a la insulina i provocant problemes vasculars. TNFα, factor de necrosi tumoral α; FFA, àcids grassos lliures; Lep, leptina; Adip, adiponectina. (Adaptat de Morrison and Farmer, 2000).

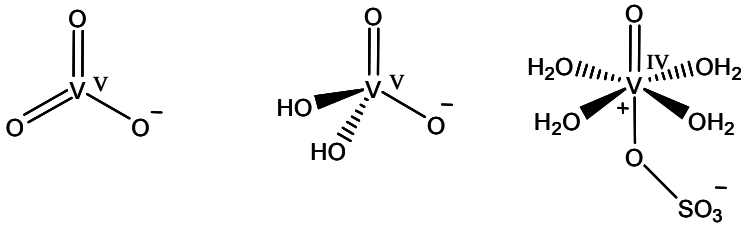
L'obesitat i la resistència a la insulina són síndromes multifactorials; en aquest sentit, les adipocitocines juguen un paper molt important (figura 8). La taula 1 resumeix les variacions observades; la leptina, el TNFα, la IL-6 i, segons les fonts, també la resistina presenten nivells elevats en l'obesitat i en estats de resistència a la insulina, mentre que l'adiponectina es troba disminuïda. L'administració de TNFα i resistina empitjora la tolerància a la glucosa, mentre que l'administració de leptina i adiponectina té efectes hipoglucemiants. Quant a la seva expressió, la leptina, l'adiponectina i la resistina s'expressen majoritàriament al teixit adipós i el TNFα i la IL-6 també es troben abundantment als macròfags i limfòcits.

Taula 1. Comparació de les adipocitocines secretades pel teixit adipós en situació d'obesitat i de resistència a la insulina.

Adipocitocina	Distribució tissular (ratolí)	Nivells de proteïna en obesitat i resistència a la insulina
Leptina	Adipós, estómac i placenta	Augmentat
TNFα	Adipós, macròfags i limfòcits	Augmentat
Adiponectina	Adipós	Disminuït
Resistina	Adipós	Augmentat/Disminuït
IL-6	Adipós, cèl·lules imunitàries, fibroblasts, cèl·lules endotelials, miòcits, cèl·lules endocrines	Augmentat

1.3. EFECTES INSULINOMIMÈTICS DEL VANADAT

El vanadi és un element traça normalment present a concentracions molt baixes en plantes i animals i s'especula que és un element essencial en la nutrició dels humans. En sistemes biològics, el vanadi es troba majoritàriament en els estats d'oxidació +IV i +V i aproximadament el 90% està lligat a proteïnes com la transferrina i l'albúmina. Per l'estat d'oxidació +V predominen les formes aniòniques metavanadat (VO_3^-) i ortovanadat ($H_2VO_4^-$), formes que s'assemblen bioquímicament al fosfat. Per l'estat d'oxidació +IV la forma en la qual es troba el vanadi és la forma vanadil (VO^{2+}), que té una semblança bioquímica amb el catió Mg^{2+}(figura 9) (Brichard and Henquin, 1995). En els humans s'estima que la reserva o *pool* total de vanadi és de 100-200 μg, i en teixits de mamífers es troba a unes concentracions de 0,014-7,2 μM (revisat a Thompson, 1999).



metavanadat **ortovanadat** **vanadil sulfat**

Figura 9. Estructures químiques de les diferents formes del vanadi en sistemes biològics.

Les primeres dades de les seves propietats mimetitzadores de l'acció de la insulina van aparèixer a finals dels anys 70 quan es van observar efectes sobre el metabolisme de la glucosa (Tolman *et al.*, 1979). Es coneixen moltes accions mimetitzadores de l'acció de la insulina sobre el metabolisme glucídic: en adipòcits de rata estimula la captació i l'oxidació de glucosa (Dubyak and Kleinzeller, 1980); en fetge de rata augmenta la síntesi de glicogen (Tamura *et al.*, 1984) i inhibeix la gluconeogènesi (Jackson *et al.*, 1988); així mateix, mimetitza l'acció de la insulina sobre el metabolisme lipídic inhibint la lipòlisi i estimulant la liponeogènesi en cèl·lules adiposes (Duckworth *et al.*, 1988). L'estimulació del transport de glucosa per

vanadat està associada a un augment de l'expressió de GLUT4 i de la seva translocació a la membrana plasmàtica (Paquet *et al.*, 1992). Es postula que la via estimulada per vanadat no passa exclusivament pel receptor de la insulina (Strout *et al.*, 1989; Venkatesan *et al.*, 1991) sinó que passa a través de l'activació d'una proteïna-quinasa citosòlica, la CytPTK (Shisheva and Shechter, 1993b) i d'una proteïna-quinasa de membrana plasmàtica, la membPTK (Elberg *et al.*, 1997) i via la inhibició de proteïnes PTP (Huyer *et al.*, 1997; Tracey and Gresser, 1986); la inhibició de les proteïnes tirosina-fosfatasa es deguda a la seva similitud estructural amb el fosfat (Brichard and Henquin, 1995).

In vivo, ja l'any 1985 es va demostrar que l'administració oral de vanadat a rates diabètiques per estreptozotocina reduïa el nivell de glucosa en sang fins a nivells normals (Heyliger *et al.*, 1985). Estudis posteriors confirmaren les propietats antidiabètiques de l'administració de vanadat en models de diabetis de tipus 1 i 2 (revisat a Srivastava, 2000). En humans amb diabetis de tipus 1 i 2, l'administració de vanadat augmenta la utilització de glucosa i la sensibilitat insulínica i redueix la producció de glucosa hepàtica (Boden *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1995; Goldfine *et al.*, 1995). Els efectes observats en humans no són tan evidents com els observats en animals a causa de la utilització de dosis menys elevades i de tractaments de menys durada (revisat a Srivastava, 2000).

L'administració de vanadat als animals s'ha fet usant tant sals inorgàniques com compostos orgànics i també en combinació amb agents quelants. En tots els casos s'observen efectes insulinomimètics independents del format d'administració del vanadat; ara bé, en el cas dels organocomplexos de vanadi la capacitat de disminuir la hiperglicèmia s'observa a concentracions més baixes que les utilitzades en el cas de les sals inorgàniques, cosa que es tradueix en menors efectes secundaris; així mateix, l'ús d'agents quelants presenta efectes antihiperglicèmics amb poca toxicitat associada, ja que s'evita l'acumulació tissular de l'ió (Domingo *et al.*, 1993).

2. AMINO-OXIDASA SENSIBLE A SEMICARBAZIDA: SSAO

2.1. PROPIETATS DE LES AMINO-OXIDASES

Les amino-oxidases (AOs) s'han dividit tradicionalment en dos grups (figura 10): els enzims intracel·lulars amb el cofactor FAD (dinucleòtid de flavina i adenina) que comprenen la monoamino-oxidasa A i B (MAO A i MAO B), la poliamino-oxidasa (PAO) i les amino-oxidases que contenen coure. Aquestes comprenen la diamino-oxidasa (DAO), la lisiloxidasa (LO) i l'amino-oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO), la qual presenta una forma de membrana i una forma soluble (sSSAO). Les amino-oxidases que contenen coure són sensibles a la inhibició per compostos que reaccionen amb els grups carbonil, com ara la semicarbazida. Aquests dos grups no presenten cap homologia estructural i difereixen en la naturalesa del seu cofactor, en la seva distribució cel·lular, els substrats (malgrat que alguns són compartits) i inhibidors i en la funció biològica (figura 10).

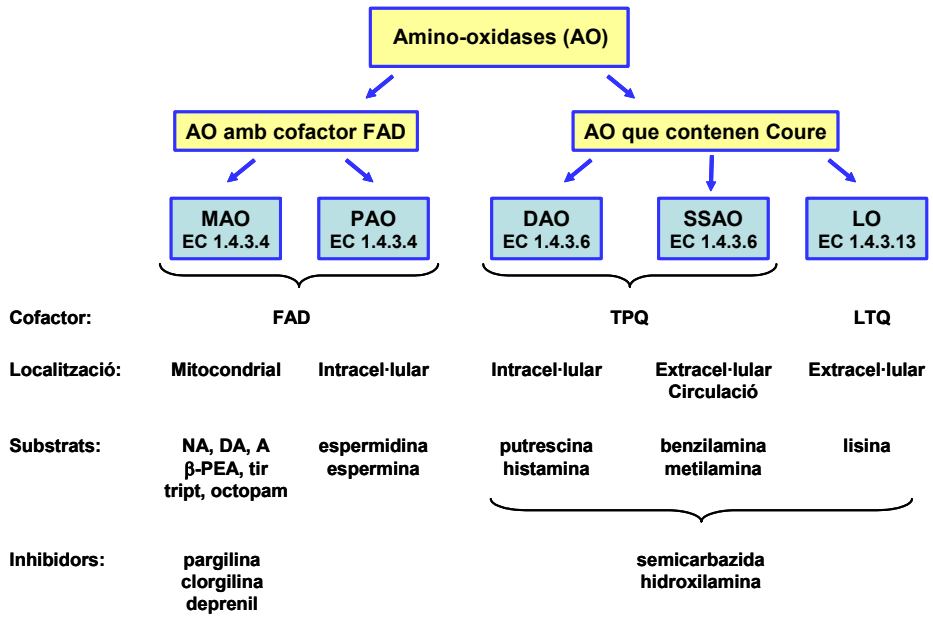


Figura 10. Classificació de les amino-oxidases. FAD, dinucleòtid de flavina i adenina; TPQ, topaquinona; LTQ, lisil-tirosil quinona; NA; noradrenalina; DA, dopamina; A, adrenalina; β-PEA, β-feniletilamina; tir, tiramina; tript, triptamina; ECM, matriu extracel·lular. (Adaptat de Jalkanen and Salmi, 2001).

La família de les amino-oxidases catalitza, en presència d'oxigen, la reacció d'oxidació d'una amina a aldehid amb l'alliberament d'amoníac (NH_3) i peròxid d'hidrogen (H_2O_2). Les característiques que ha de tenir l'amina perquè sigui oxidada depenen del tipus d'enzim que catalitza la reacció; així, per exemple, mentre que la MAO oxida amines primàries, secundàries i terciàries, la PAO oxida poliamines, la DAO diamines i l'SSAO, majoritàriament, amines primàries (figura 10).

La DAO i les SSAO, són enzims amb el cofactor topaquinona (TPQ) (EC 1.4.3.6). La

lisiloxidasa (EC 1.4.3.13) difereix de la resta de membres de la família per diferents motius. Malgrat que és sensible a la semicarbazida, el seu cofactor no és TPQ sinó una lisiltirosilquinona (LTQ) (Wang *et al.*, 1997). A més a més, no és dimèrica, el seu pes molecular és tan sols de 32 kDa i en la seva seqüència no en troben alguns dels motius conservats a la resta de membres com ara les histidines, que coordinen l'àtom de coure (vegeu més avall). La funció de la lisiloxidasa en la formació de la matriu extracel·lular creant unions col·lagen-elastina està ben caracterizada (Kagan *et al.*, 1984).

La diamina oxidasa és un enzim intracel·lular sintetitzat principalment al ronyó i a l'intestí (Schwelberger *et al.*, 1998). Hi ha una forma secretada que s'uneix a les cèl·lules endotelials de manera dependent de la heparina (Biebl *et al.*, 2002). Està implicada en regulació de processos d'inflamació i reaccions al·lèrgiques, atès oxida la histamina, i en el control de la proliferació cel·lular, perquè participa en la via de síntesi de les poliamines (Quash *et al.*, 1979). En humans, hi ha diverses formes clonades de la DAO; la forma clonada en ronyó (hkDAO) i dues formes clonades en placenta (hpDAO1 i hpDAO2). hkDAO i hpDAO1 difereixen en dos parells de bases de la regió codificant i lleugerament en les regions 3' i 5' no codificants; s'ha proposat que es tracta de dos polimorfismes del mateix gen (Zhang *et al.*, 1995). hpDAO2; en canvi, difereix en una seqüència de 19 aminoàcids amb hpDAO1, aquesta seqüència correspon a l'extrem 3' de l'intró 3, i també difereix amb hpDAO1 i hkDAO en 13 parells de bases de la zona 5' no traduïda; així doncs, no està clar si hpDAO2 és una altra forma polimòrfica o si es tracta d'un gen diferent (Zhang *et al.*, 1995). A partir d'ara en referir-nos a hDAO ens referirem a la hpDAO1.

L'any 1998, el clonatge de la proteïna d'adhesió vascular-1 humana (hVAP-1) (Smith *et al.*, 1998) va mostrar que aquesta presentava una elevada homologia amb les SSAO, sent idèntica a la hpAO (amino-oxidasa de placenta humana).

El treball d'aquesta tesi s'ha focalitzat en l'estudi de l'SSAO; per aquest motiu la introducció està restringida a ella, encara que en alguns casos s'inclouen dades sobre altres membres del seu subgrup (amino-oxidases que contenen coure).

2.1.1. LES AMINO-OXIDASES EN LES DIFERENTS ESPÈCIES

S'han identificat amino-oxidases que contenen coure en bacteris, llevats, plantes i mamífers. Les amino-oxidases de bacteris, llevats i plantes que presenten el cofactor TPQ i són sensibles a semicarbazida no han estat classificades com a SSAO o DAO i se les anomena amino-oxidases que contenen coure; el nom d'SSAO, tot i que tota la família és sensible a semicarbazida, queda restringit a les proteïnes de manífers diferents de les DAO i les LO. A la figura 11 es mostra l'arbre filogenètic i a la figura 12 les homologies de seqüència de les diferents formes clonades de la família d'amino-oxidases que contenen coure.

La proteïna humana (hVAP-1 o hpAO) presenta un major grau d'homologia amb la proteïna homòloga de ratolí (mVAP-1) (83% d'homologia) seguida de la forma soluble bovina (BSAO) (80%) i la forma humana de retina (hRAO) (64%); en aquesta última s'han descrit diferents variants d'empalmament o *splicing* (Imamura *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 1998). En rates, la forma corresponent a la hVAP-1 (rVAP-1) ha estat només parcialment clonada i presenta un 83% d'homologia (Morris *et al.*, 1997). La publicació del genoma humà va permetre observar que les dues formes descrites de l'SSAO humana (hRAO i hVAP-1) són les úniques que existeixen. Aquestes formes es troben codificades pels gens AOC2 i AOC3 (hRAO i hVAP-1, respectivament) agrupats al braç llarg del cromosoma 17 a la regió q21, on també s'ha localitzat un pseudogen (LOC90586). L'absència d'altres gens que codifiquin per SSAO en el genoma humà suporta la idea que en humans la forma soluble d'SSAO, que es troba a la circulació ve donada per un *splicing* alternatiu o per un processament proteolític de la forma de membrana. En el cas de ratolí, la publicació del seu genoma ha identificat una proteïna que s'ha descrit com l'homòloga a la forma de retina humana (83% a la hRAO) (Annotation Project, 2002).

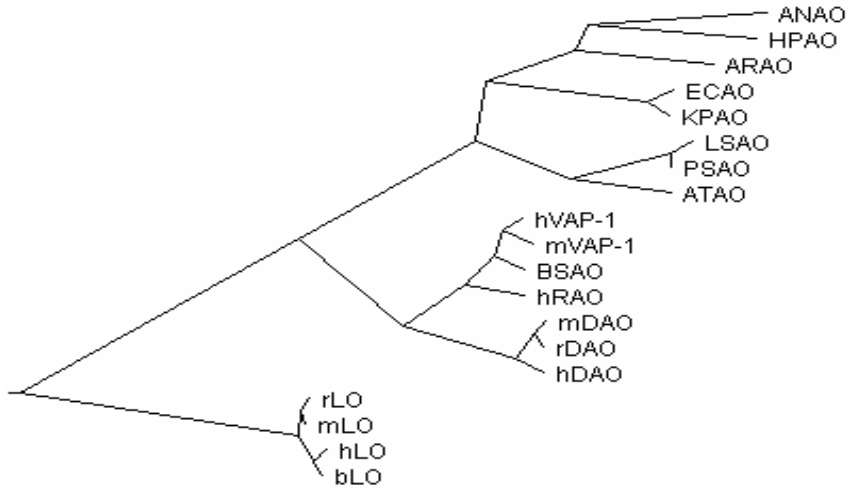


Figura 11. Arbre filogenètic de les amino-oxidases que contenen coure. LSAO, "lentil seedling copper-containing amine oxidase" (amino-oxidasa de llentia) (Hartmann *et al.*, 1993; Klinman and Mu, 1994; Rossi *et al.*, 1992; Taha and Klip, 1999); **PSAO**, "pea seedling copper amine oxidase" (amino-oxidasa de pèsol) (Hartmann *et al.*, 1993; Tipping and McPherson, 1995; Wilmot *et al.*, 1999); **ATAO**, "*Arabidopsis thaliana* copper amine oxidase" (Moller and McPherson, 1995); **KPAO**, "*Klebsiella aerogenes* copper amine oxidase" (Sugino *et al.*, 1992); **ECAO**, "*Escherichia coli* copper amine oxidase" (Parsons *et al.*, 1995; Roh *et al.*, 1994); **ARAO**, "*Arthrobacter sp*, strain P1, copper-containing amine oxidase" (Zhang *et al.*, 1993); **HPAO**, "*Hansenula polymorpha* copper-containing amine oxidase" (Bruinenberg *et al.*, 1989); **ANAO**, "*Aspergillus niger* copper-containing amine oxidase" (Frebort *et al.*, 1996); **BSAO**, "bovine serum amine oxidase" (amino-oxidasa de sèrum boví que va ser clonada a partir del fetge) (Mu *et al.*, 1994); **hVAP-1**, "human vascular adhesion protein 1" (proteïna d'adhesió vascular humana 1) (Smith *et al.*, 1998) (AOC3) = hpAO, "human placental amine oxidase" (amino-oxidasa de placenta humana) (Zhang and McIntire, 1996); **hRAO**, "human retina-sepecific amine oxidase" (amino-oxidasa de retina humana) (Imamura *et al.*, 1997) (AOC2) ; **mVAP-1**, "mouse vascular adhesion protein 1" (proteïna d'adhesió vascular de ratolí 1) (Bono *et al.*, 1998b); **hDAO**, "human diamine oxidase = human amiloride binding proteïn" (diamino-oxidasa humana = proteïna d'unió a amilòrid) (AOC1) (Shimomura *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1995); **mDAO**, "mouse diamine oxidase" (diamino-oxidasa de ratolí) (Strausberg *et al.*, 2002); **rDAO**, "rat diamine oxidase" (diamino-oxidasa de rata)(Linguelia *et al.*, 1993), **hLO**, **mLO**, **rLO** i **bLO**, lisiloxidasa humana, de ratolí, de rata i bovina respectivament (Borel *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2001; Strausberg, 2001; Trackman *et al.*, 1990).

En un següent bloc d'homologia es troben les proteïnes diamino-oxidases amb homologies del 49% ja sigui la forma humana (hDAO), de ratolí (mDAO) o de rata (rDAO). La

proteïna hDAO es troba codificada pel gen AOC1 (també anomenat ABP1 de *amiloride binding protein 1*) localitzat al cromosoma 7 regió q34-q36.

A una distància més llunyana filogenèticament, i amb homologies de seqüència d'entre un 15 i un 17% es troben les amino-oxidases que contenen coure de llevat (HPAO), fong (ANAO), bacteris (ARAO, ECAO, KPAO) i plantes (LSAO, PSAO, ATAO).

Finalment, trobem les formes humana (hLO), de ratolí (mLO), de rata (rLO) i bovina (bLO) de la lisiloxidasa que presenten homologies de seqüència d'entre l'11% i el 12% amb la hVAP-1.

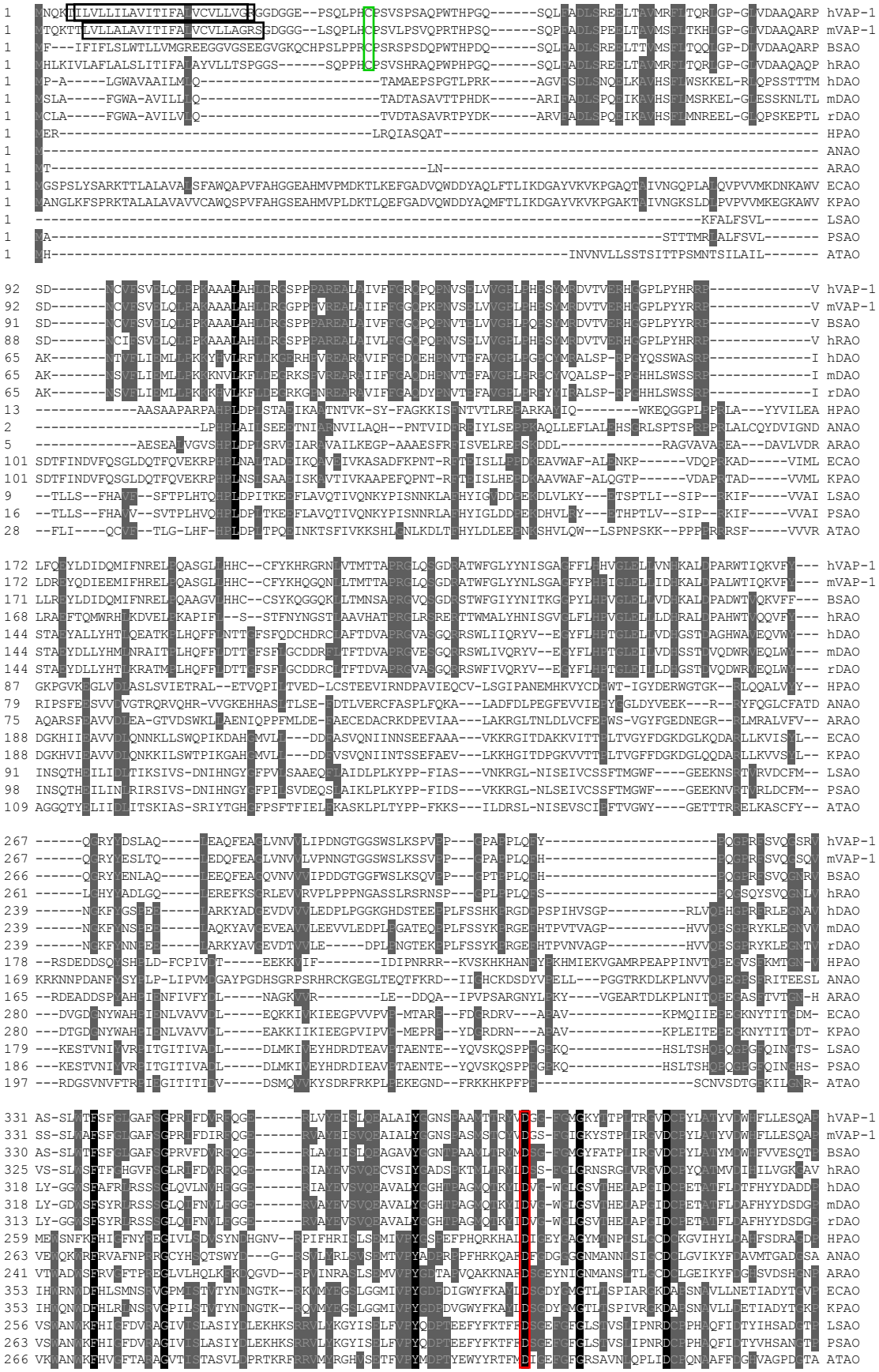
Percentatge d'identitat

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
	83.1	79.5	64.4	35.8	35.7	35.9	15.2	14.9	16.4	16.0	15.9	15.1	15.3	17.1	10.9	12.4	12.5	12.0	**1**	hVAP-1
		76.2	62.4	37.2	37.0	37.3	15.2	14.6	15.9	15.2	13.4	14.8	14.5	16.8	12.2	12.9	10.8	10.5	**2**	mVAP-1
			60.6	36.8	36.0	36.3	14.6	13.9	16.8	15.3	15.0	16.5	15.1	17.4	12.4	12.7	11.0	12.7	**3**	BSAO
				37.0	36.5	37.0	15.3	13.9	16.5	17.7	17.2	15.6	15.0	17.5	11.7	11.9	12.7	11.5	**4**	hRAO
					79.2	81.0	15.3	13.0	14.8	16.0	15.7	16.0	16.6	17.5	11.4	11.2	11.5	10.8	**5**	hDAO
						91.7	14.5	12.7	15.0	16.0	15.4	16.3	16.9	17.8	11.2	10.7	11.3	11.0	**6**	mDAO
							15.0	13.1	15.3	15.5	15.1	16.2	16.3	17.4	11.7	11.9	11.8	10.8	**7**	rDAO
								24.6	27.9	20.2	21.2	19.2	19.6	19.9	11.9	11.9	12.5	12.2	**8**	HPAO
									27.3	17.5	18.1	18.4	18.7	18.7	10.5	12.2	9.8	11.0	**9**	ANAO
										24.4	26.5	23.1	23.6	21.5	11.2	11.7	10.6	11.0	**10**	ARAO
											84.1	23.4	23.6	23.7	10.2	10.5	10.1	10.5	**11**	ECAO
												22.8	22.8	22.6	11.4	11.7	12.0	12.0	**12**	KPAO
													92.5	43.3	10.7	10.7	10.8	9.8	**13**	LSAO
														44.0	10.5	10.5	11.0	10.5	**14**	PSAO
															11.4	11.2	10.3	10.3	**15**	ATAO
																95.4	85.6	85.2	**16**	rLO
																	86.9	84.2	**17**	mLO
																		88.7	**18**	hLO
																			19	bLO

Figura 12. Homologies de seqüència de les amino-oxidases que contenen coure. Les abreviatures corresponen a les amino-oxidases descrites a la figura 11.

A part de les formes clonades descrites, han estat parcialment purificades la forma soluble i de membrana de la VAP-1 de porc (Holt *et al.*, 1998) i s'han identificat 3 membres que formarien una família d'SSAO en teixits bovins (Hogdall *et al.*, 1998).

A la figura 13 es presenta un alineament de la seqüència proteica de les amino-oxidases amb cofactor topaquinona (SSAO i DAO).



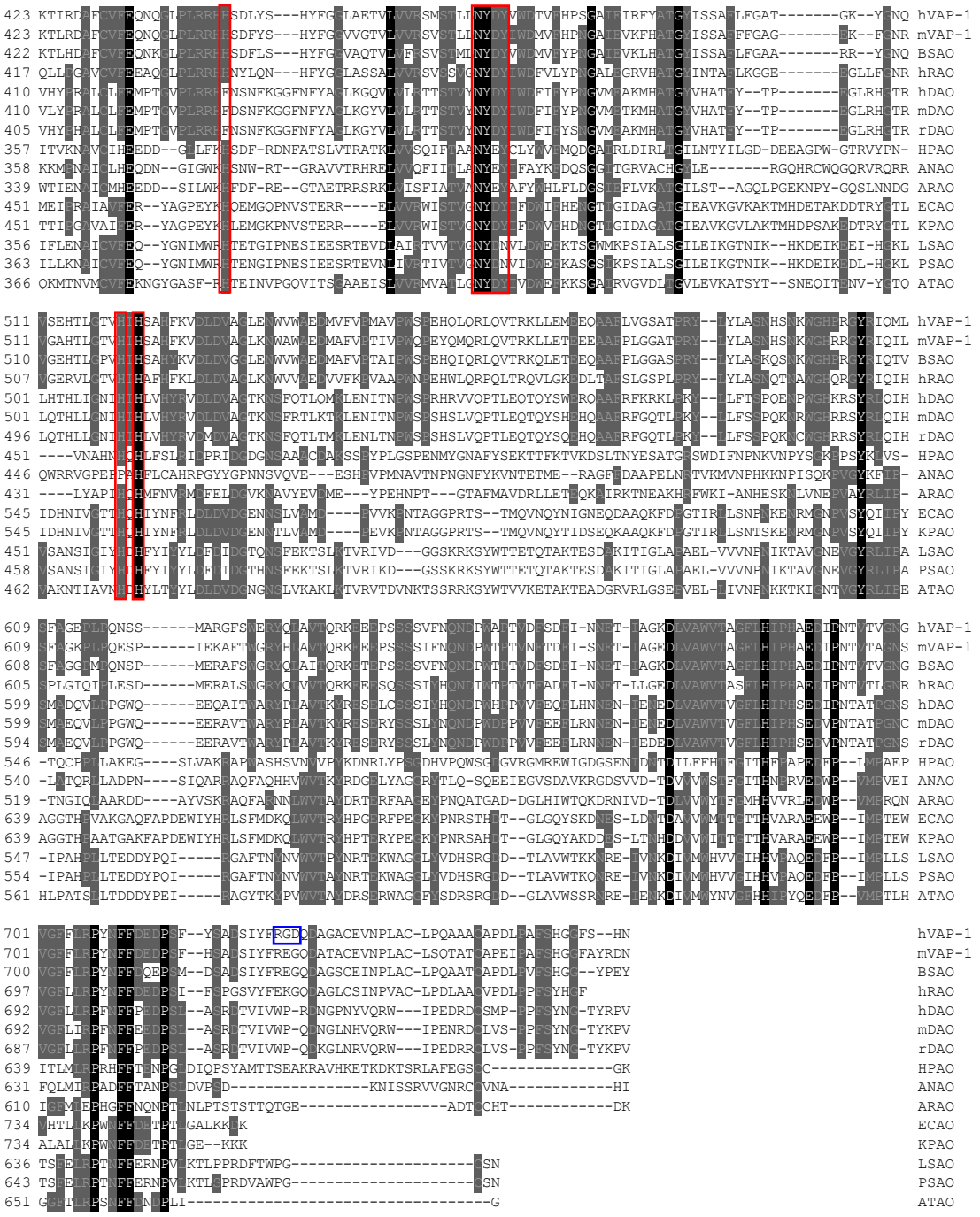


Figura 13. Alineaments de la seqüència proteica de les amino-oxidases amb cofactor topaquinona EC 1.4.3.6. Les abreviatures corresponen a les amino-oxidases descrites a la figura 10. Les ombres negres indiquen els aminoàcids conservats en totes les seqüències, les grises indiquen els aminoàcids conservats en un mínim de set seqüències. El requadre negre indica la seqüència transmembrana postulada de la forma hVAP-1 i mVAP-1. Els requadres vermells indiquen els elements principals del centre catalític (D: àcid aspàrtic, H: histidina, NYD/EY: asparagina-tiramina-aspàrtic/glutàmic-tiramina, la primera tiramina és la que es transforma en el cofactor topaquinona). El requadre blau indica la seqüència RGD homòloga a altres proteïnes d'adhesió. El requadre verd indica la cisteïna a partir de la qual la BSAO i les formes de membrana (hVAP-1, hVAP-1 i hRAO) comencen la seva homologia de seqüència.

A la figura 14 es presenta una alineament de la seqüència proteica de les amino-oxidases humanes que contenen coure (hVAP-1, hRAO, hDAO i hLO).

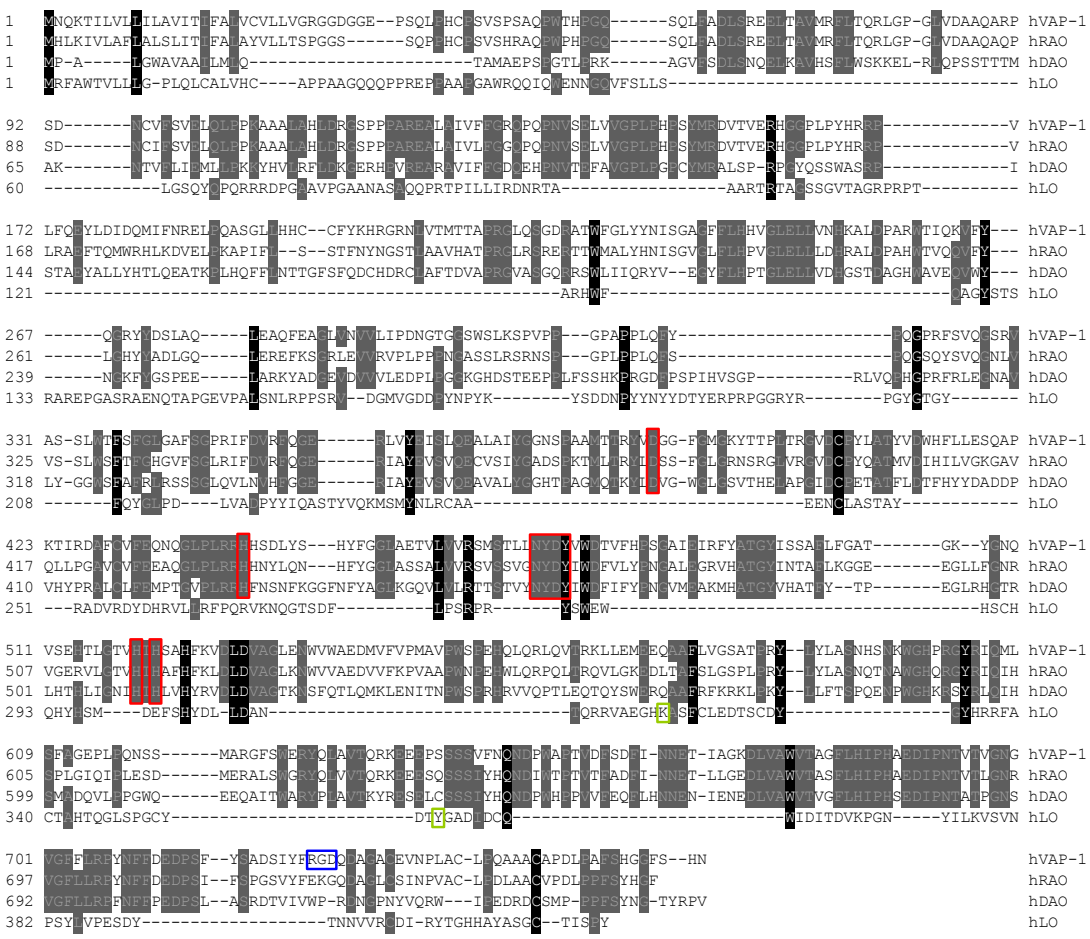


Figura 14. Alineaments de la seqüència proteica de les amino-oxidases humanes que contenen coure. Les abreviatures corresponen a les amino-oxidases descrites a la figura 10. Les ombres negres indiquen els aminoàcids conservats en totes les seqüències, les grises indiquen els aminoàcids conservats en tres seqüències. Els requadres vermells indiquen els elements principals del centre catalític (D: àcid aspàrtic, H: histidina, NYDY: asparagina-tiramina-aspàrtic-tiramina) de les SSAO i la DAO. El requadre blau indica la seqüència RGD de la hVAP-1 homòloga a altres proteïnes d'adhesió. Els requadres verds indiquen la Lys320 i la Try355 progenitores del cofactor lisiltirosilquinona (LTQ) de la lisiloxidasa.

2.1.2. ESTRUCTURA DE LES SSAO

Els ectoenzims són proteïnes que presenten el seu domini catalític a l'exterior de la cèl·lula i que tenen la capacitat de catalitzar reaccions enzimàtiques en les immediacions de la superfície cel·lular regulant la concentració dels substrats i productes en el lloc on poden ser biològicament actius. Els ectoenzims són sovint glicoproteïnes amb diferents dominis i amb cadenes d'oligosacàrids que participen en fenòmens de reconeixement no enzimàtic. En aquest sentit SSAO és un ectoenzim amb funció dual d'activitat enzimàtica amino-oxidasa i amb propietats d'adhesió.

Les SSAO són glicoproteïnes dimèriques amb un pes molecular aparent en mamífers de 180-220 kDa i que contenen un àtom de coure per monòmer. El cofactor TPQ (2,4,5-trihidroxifenilalanina) del centre actiu es genera a partir de la tirosina continguda a la seqüència conservada **Asn-X-Asp/Glu-Tyr** (X = Tyr transformada en TPQ, Asn 470, Tyr471, Asp472 i Tyr473 en la seqüència de hVAP-1) (Janes *et al.*, 1990; Klinman, 1996) per un procés espontani que tan sols necessita la unió de coure i d'oxigen molecular (Mu *et al.*, 1992) (figura 15). Aquesta seqüència forma part del centre actiu de l'enzim (Klinman and Mu, 1994; Salminen *et al.*, 1998).

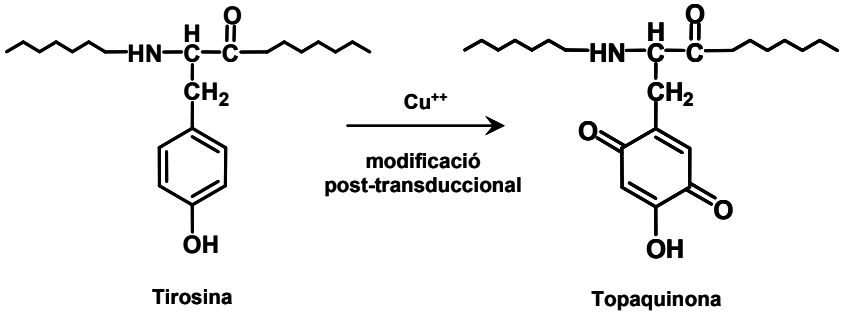


Figura 15. Formació del cofactor topaquinona.

Hi ha tres histidines conservades en les SSAO que coordinen els àtoms de coure. Un motiu His-X-His uns 50 residus cap a l'extrem C-terminal del cofactor i una altra histidina entre 20 i 30 residus cap a l'extrem N-terminal (histidines 444, 520 i 522 en la seqüènica de hVAP-1). Hi ha també un residu conservat d'àcid aspàrtic uns 100 aminoàcids cap a l'extrem N-terminal del centre catalític que funciona com a base catalítica en la semireacció de reducció (Asp 386 en la seqüènica de hVAP-1) (figura 13). Els motius estructurals més conservats es representen a la figura 16. Aquests motius també estan conservats en les DAO (figura 13).

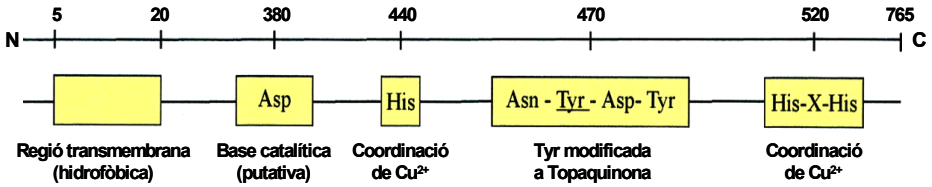


Figura 16. Motius conservats de les SSAOs A l'extrem N-terminal, s'indica el fragment transmembrana anteriorment es considera un pèptid senyal. Es mostren les posicions característiques de la base catalítica, les histidines que coordinen el coure i la seqüència del centre catalític conservada amb la tirosina que es modifica a topaquinona. La línia superior indica els aminoàcids dels motius conservats (es tracta de números aproximats a causa de la diferent longitud de les diferents SSAO). (Jalkanen and Salmi, 2001).

Les SSAO són proteïnes de membrana de tipus 2 (excepte la forma soluble que es troba en la circulació), amb un domini citoplasmàtic N-terminal de només 5-6 aminoàcids, un únic fragment transmembrana i un gran segment extracel·lular (Salminen *et al.*, 1998) (figura 17). El fragment hidrofòbic, considerat un domini transmembrana, va ser inicialment descrit com un pèptid senyal per a la secreció ja que conté un lloc potencial de tall a la posició 19 (Zhang and McIntire, 1996). Actualment, aquesta regió, després d'haver estat seqüenciada a la proteïna de

membrana purificada i atesa la hidrofobicitat de les regions flanquejants que presenta, es considera una regió transmembrana (Smith *et al.*, 1998).

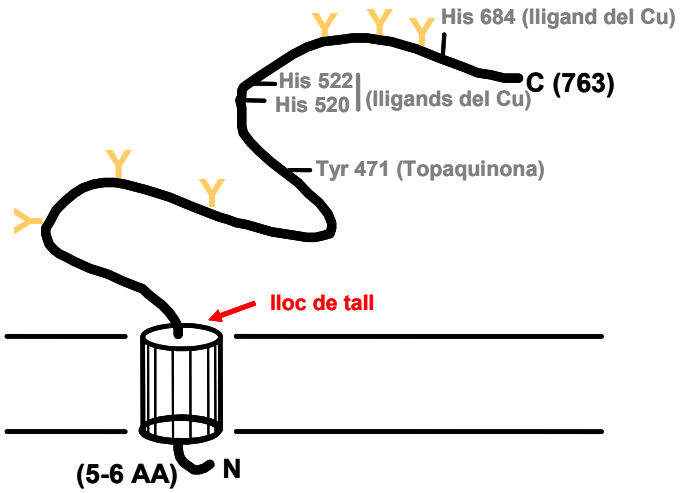


Figura 17. L'SSAO és una glicoproteïna homodimèrica de tipus 2. L'SSAO conté una petita cua N-terminal citoplasmàtica, un únic domini transmembrna i un domini extracel·lular glicosilat. S'indica el lloc putatiu de tall amb una fletxa vermella, els llocs de N-glicosilació amb Y grogues, la tirosina del centre catalític transformada en topaquinona i les histidines que lliguen el coure.

A partir de l'estructura cristal·logràfica de l'amino-oxidasa d'*Escherichia coli* (Parsons *et al.*, 1995) es va fer la modelització estructural de la proteïna humana; aquest suggereix que, com la proteïna bacteriana, la proteïna humana conté quatre dominis (D1-D4) (Salminen *et al.*, 1998). D4 (Pro318-Asn763) és el domini catalític que conté el centre actiu, presenta una estructura globular en forma de bolet on hi ha la interfase del dímer i un canal que connecta el centre catalític amb l'exterior (figura 18). D2 i D3 són dominis més petits que envolten el domini D4 prop de l'entrada al centre actiu. Tots dos monòmers estan units mitjançant enllaços covalents (dues de les cinc cisteïnes presents a D4 estan conservades a la majoria de les amino-oxidases amb cofactor TPQ i poden formar un pont disulfur) i interaccions no covalents de dos *β-hairpin turns* del domini 4 (figura 18 A).

L'anàlisi de la seqüència mostra que cada monòmer conté sis llocs putatius d'N-glicosilació i tres d'O-glicosilació (Smith *et al.*, 1998). L'ocupació d'aquests llocs no ha estat completament establerta; en el cas de la proteïna humana, experiments de digestió amb diferents glicosidases indiquen que presenta tant N com O-glicosilació (Salmi and Jalkanen, 1996); el modelatge estructural, en canvi, indica que els llocs putatius d'O-glicosilació no poden ser glicosilats en no trobar-se a la superfície de la proteïna i implica a dos d'ells en l'ancoratge de VAP-1 a la membrana (Salminen *et al.*, 1998). En el cas dels llocs per a N-glicosilació, experiments de mutagènesi dirigida indiquen que tots ells estan ocupats (Salmi and Jalkanen, 2001b). En el cas de la proteïna de ratolí tan sols els llocs d'N-glicosilació es troben ocupats (Bono *et al.*, 1999).

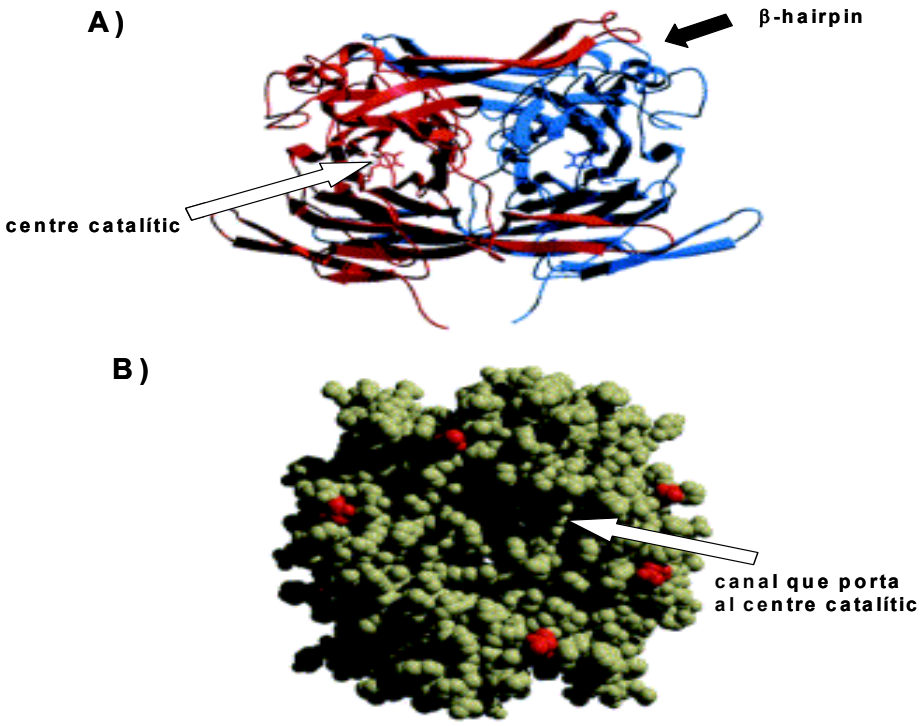


Figura 18. Plegament del domini D4. A: Els dos monòmers estan en vermell i blau. Les fulles β s'indiquen com a fletxes i les hèlix α, com a espirals. La fletxa blanca indica el centre actiu en un dels monòmers i la fletxa negra indica el *β-hairpin* que forma la interfase entre els dos monòmers. **B:** Forma de bolet del dímer on s'indiquen en vermell els llocs d'N-glicosilació exposats a la cara superior de la molècula i on es veu el canal que porta al centre actiu. (Salmi and Jalkanen, 2001b).

2.1.3. LOCALITZACIÓ TISSULAR DE L'SSAO

L'SSAO s'expressa majoritàriament al teixit adipós blanc (Raimondi *et al.*, 1991), on presenta la màxima activitat enzimàtica, al pulmó (Lewinsohn, 1984), l'intestí i l'aorta (Bono *et al.*, 1999; Hysmith and Boor, 1987; Moldes *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2001). Entre els tipus cel·lulars amb major expressió es troben els adipòcits, les cèl·lules endotelials (Bono *et al.*, 1998a) i les cèl·lules musculars llises (Hysmith and Boor, 1988; Lewinsohn, 1984; Lyles and Fitzpatrick, 1985).

També hi ha expressió al teixit adipós marró (Barrand and Callingham, 1982), el ronyó, el pàncrees (Andres *et al.*, 2001) i la melsa i en altres teixits com ara el cartílag de rata (Lyles and Bertie, 1987), els odontoblasts de polpa dentària de porc (Norqvist *et al.*, 1981) i diferents parts de l'ull boví (Fernandez de Arriba *et al.*, 1991). Pel que fa a múscul esquelètic, tot i que s'hi ha descrit presència d'SSAO, la seva expressió sembla que està restringida a les cèl·lules endotelials i no pas al miòcits (Jaakkola *et al.*, 1999).

Trobem també una forma circulant al plasma. L'any 1957, Bergeret i col·laboradors (Bergeret *et al.*, 1957) van descriure per primera vegada l'activitat SSAO en el plasma. Malgrat que fa més de quaranta anys que es coneix aquesta forma, tot i que se n'han trobat alguns

indicis, no se n'ha determinat la procedència ni la funció biològica.

2.1.4. REACCIÓ ENZIMÀTICA

Les SSAO catalitzen una reacció oxidativa de desaminació d'amines primàries (revisat a Klinman and Mu, 1994):

$$R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 + O_2 + H_2O \longrightarrow R\text{-}CHO + H_2O_2 + NH_3$$

La reacció cinètica segueix el mecanisme de *ping pong* (Hartmann *et al.*, 1993; Klinman and Mu, 1994; Wilmot *et al.*, 1999) i consisteix en dues semireaccions (figura 19): en la primera es redueix l'enzim i s'allibera l'aldehid corresponent; en la segona es reoxida l'enzim amb oxigen molecular recuperant-se la forma original oxidada del cofactor TPQ i s'allibera peròxid d'hidrogen i amoníac. Durant la semireacció de reducció es forma un enllaç covalent de base de Schiff entre l'enzim i el substrat abans d'alliberar-se l'aldehid (pas 3 figura 19) (Dooley *et al.*, 1991; Hartmann *et al.*, 1993).

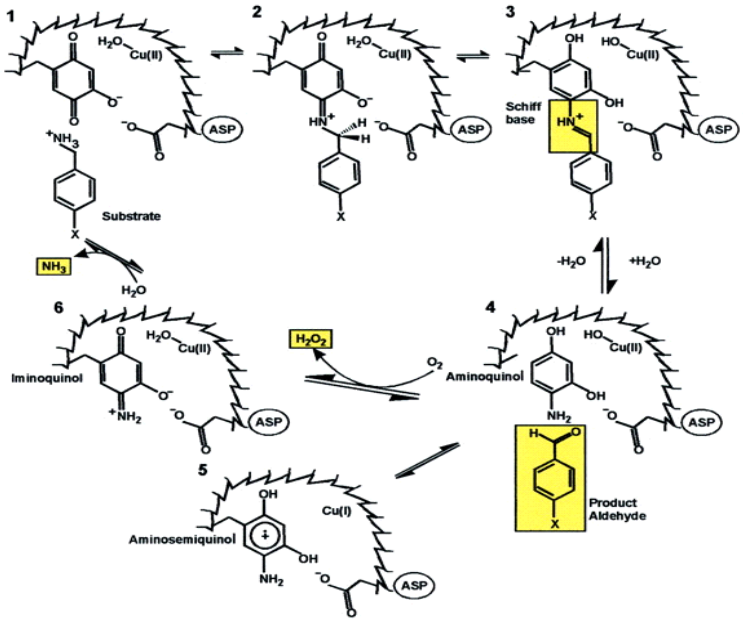


Figura 19. Reacció catalitzada per l'SSAO. En la semireacció reductiva (passos 1-4) l'amina primària interacciona amb el TPQ de l'enzim. A continuació, la base catalítica (aspàrtic) extreu un protó i forma una base de Schiff. Tot seguit es produeix la hidròlisi, s'allibera l'aldehid i el cofactor reduït es queda unit a l'enzim. A la semireacció oxidativa (passos 5, 6 i 1) l'enzim reduït es recicla per un mecanisme dependent de coure i oxigen. En aquesta semireacció s'allibera l'amoni i el peròxid d'hidrogen (Hartmann *et al.*, 1993; Klinman and Mu, 1994; Wilmot *et al.*, 1999).

Es coneixen diferents amines primàries que són substrat de l'SSAO, amines aromàtiques com ara la benzilamina, la tiramina, la histamina i la β-fenilalanina entre altres, i amines alifàtiques com per exemple la metilamina i l'aminoacetona. Segons l'espècie, s'observen diferents preferències per oxidar un o altre tipus d'amina (revisat a Lyles, 1996). El mecanisme

que explica la selectivitat de substrat entre les diferents espècies no està clar. Alguns autors l'atribueixen a diferències en l'estructura terciària del canal de la superfície de l'enzim que porta al centre catalític (Wilce *et al.*, 1997) ja que aquest no està tant conservat com el centre catalític en les diferents espècies. Altres, en canvi, no troben correlació entre l'estructura del canal i la selectivitat de substrat (Wilmot *et al.*, 1997). Així, per exemple, l'aminoàcid considerat crític a l'entrada del canal és una tirosina en la proteïna de ratolí i en la humana però la proteïna de ratolí oxida les amines aromàtiques millor que la humana. A més a més, els dos aminoàcids prop del centre catalític, que també han estat implicats en la selectivitat de substrat, són en aquestes dues proteïnes una leucina (Salminen *et al.*, 1998; Wilce *et al.*, 1997).

El substrat endogen de l'SSAO no ha estat descobert; hi ha, però, dues amines endògenes que poden ser oxidades per l'SSAO: la metilamina, formada durant la degradació de la sarcosina, la creatinina i l'adrenalina (Jones and Burnett, 1975), i l'aminoacetona, formada a partir del metabolisme de la glicina i la treonina (Lyles and Chalmers, 1992). La metilamina també es troba en diversos aliments i en el tabac.

2.2. IMPLICACIONS FISIOLÒGIQUES DE L'SSAO

La funció fisiològica de l'SSAO no ha estat clarament establerta; als procariotes, les amino-oxidases que contenen coure presents els permet usar amines com a fonts de carboni i nitrogen (Yamada *et al.*, 1965). A les plantes el peròxid d'hidrogen produït en la reacció enzimàtica catalitzada per les amino-oxidases que contenen coure ha estat implicat en la cicatrització i l'aldehid es considera un precursor per a la generació de compostos amb anells heterocíclics tipus alcaloides (Tabor and Tabor, 1964).

En general, l'SSAO és una proteïna multifuncional i la seva funció depèn del teixit on s'expressa; en mamífers, per la seva acció catalítica, contribueix al metabolisme d'amines endògenes i xenobiòtiques i està subjecte a interaccions, tant activadores com inhibidores, dels productes de la seva reacció i d'altres molècules fisiològiques. L'SSAO de plasma boví s'ha implicat en la maduració de l'elastina i en la modificació posttraduccional de proteïnes (Wang *et al.*, 1996); així mateix, a les neurones, presenta efectes sobre els canals iònics de potassi (Wu *et al.*, 1996).

2.2.1. PAPER DE L'SSAO COM A PROTEÏNA D'ADHESIÓ

VAP-1 és una proteïna d'adhesió que s'expressa a cèl·lules endotelials que va ser identificada per primera vegada pel grup de la Dra. Sirpa Jalkanen l'any 1992 durant assajos d'adhesió de leucòcits (Salmi and Jalkanen, 1992). VAP-1 s'expressa de manera constitutiva en grànuls intracel·lulars de cèl·lules endotelials i només en condicions d'inflamació es transloca del compartiment intracel·lular a la membrana de la cèl·lula (Jaakkola *et al.*, 2000;

Salmi *et al.*, 1993).

VAP-1 no té una homologia significativa amb altres proteïnes d'adhesió descrites, només conté un motiu RGD (figura 13) sense cap altre dels dominis característics de les proteïnes d'adhesió (Smith *et al.*, 1998). Ara bé, aquest motiu, localitzat per modelatge estructural a la superfície de la proteïna (Salminen *et al.*, 1998), està implicat en la funció d'adhesió d'altres proteïnes (D'Souza *et al.*, 1991) i és crucial per a l'adhesió entre la fibronectina i la integrina (Ruoslahti and Pierschbacher, 1986). Tot i que l'SSAO/VAP-1 presenta una estructura força diferent de les proteïnes endotelials d'adhesió, el fet d'expressar-se en cèl·lules no endotelials de diferents teixits i de presentar una funció enzimàtica és una característica comuna descrita en altres proteïnes d'adhesió (revisat a Salmi and Jalkanen, 2001b).

2.2.1.1. FISIOLOGIA DE LA FUNCIÓ D'ADHESIÓ DE L'SSAO

Els limfòcits han de migrar de la circulació sanguínia als teixits inflamats per fer la seva funció de defensa (revisat a Butcher and Picker, 1996). En aquest procés seqüencial de contactes entre receptors de la superfície dels leucòcits i els seus lligands a les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis, intervenen gran quantitat de proteïnes d'adhesió (figura 20). Mitjançant estudis d'inhibició de la funció d'adhesió de VAP-1/SSAO amb anticossos específics se l'ha implicat tant a l'etapa de rodar els limfòcits sobre l'endoteli (*rolling*) com a l'etapa d'extravasació (diapèdesi) (Lalor *et al.*, 2002; Tohka *et al.*, 2001).

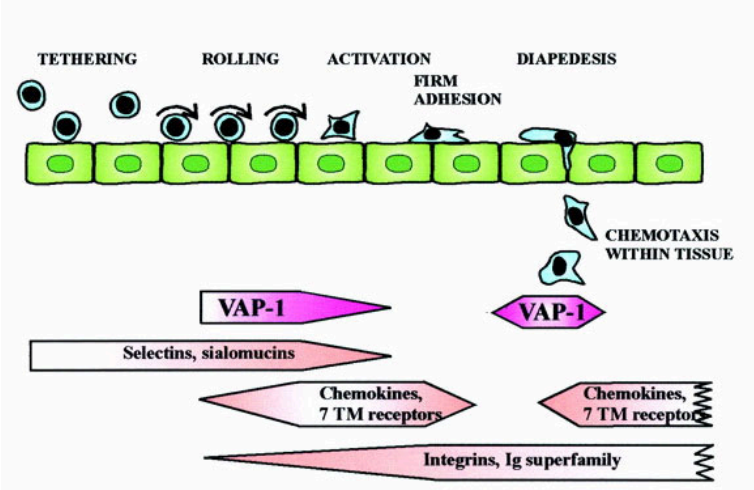


Figura 20. Cascada d'extravasació de leucòcits. Es mostren els diferents passos de la cascada d'adhesió i les superfamílies de les molècules d'adhesió implicades. VAP-1 intervé en els processos de *rolling* i contribueix en el procés d'extravasació. (Jalkanen and Salmi, 2001).

El procés normal de recirculació de limfòcits s'altera en els processos d'inflamació i, com ja s'ha comentat, VAP-1 es transloca a la membrana plasmàtica de la cèl·lula. En aquest sentit, l'expressió de VAP-1 es troba augmentada a les cèl·lules endotelials dels vasos de diferents òrgans en situació d'inflamació: *a*) de pàncrees endocrí de ratolí durant el desenvolupament

d'insulinitis (Bono *et al.*, 1999), *b*) de ronyons que han patit rebuig; quan s'utilitzen anticossos específics contra VAP-1 l'adhesió dels limfòcits als vasos es redueix més d'un 50% (Kurkijarvi *et al.*, 2001), *c*) de fetge trasplantat i rebutjat de rata (Martelius *et al.*, 2000). També s'ha observat un augment de VAP-1 en el desenvolupament d'artritis. El bloqueig de la funció d'adhesió de VAP-1 generat per la utilització d'anticossos específics inhibeix la unió dels leucòcits de pacients amb malaltia de Crohn i colitis ulcerosa als vasos de les articulacions (Salmi and Jalkanen, 2001a). Així mateix, en el cor isquèmic humà, VAP-1 pot participar en la destrucció del teixit cardíac mediada per leucòcits (Jaakkola *et al.*, 2000).

Abans que es conegués la identitat entre l'SSAO i la VAP-1, diversos autors havien descrit un augment d'SSAO en situacions d'inflamació (revisat a Callingham *et al.*, 1995; Lewinsohn, 1984); en aquest sentit s'havia observat que l'SSAO podia modular la resposta inflamatòria a través dels seus propis substrats, ja que amines com la metilamina es poden unir a la α2-macromglobulina, induint un canvi conformacional que provoca la seva eliminació (Misra *et al.*, 1993). D'altra banda, el H_2O_2 format per l'acció catalítica de l'SSAO contribueix a l'oxidació de l'α2-macroglobulina, cosa que es tradueix en un procés agut d'inflamació i en un augment de les activitats reparadores del teixit (Wu *et al.*, 1998).

La funció d'adhesió de l'SSAO necessita dels àcids siàlics de la proteïna. Quan els àcids siàlics s'eliminen per tractament amb sialidasa es perd la capacitat de VAP-1 per unir limfòcits; això indica que el procés d'adhesió es troba mediat per carbohidrats. En aquest sentit, el modelatge estructural de la proteïna va indicar que tres dels llocs putatius de N-glicosilació estaven col·locats cap a l'exterior de la proteïna i, per tant, disponibles per a una interacció (Salminen *et al.*, 1998). El tipus de modificació posttranscripcional és important per a la funció d'adhesió, així només algunes poblacions de cèl·lules endotelials, les quals presenten una determinada glicosilació, són capaces d'adherir limfòcits (Salmi and Jalkanen, 1996). El fet que la interacció entre els limfòcits i les cèl·lules endotelials estigui mediada per carbohidrats i el paper crític de la correcta glicosilació també s'ha d'escrit en altres proteïnes d'adhesió com ara l'E-selectina i la P-selectina (Lasky, 1995; Steegmaier *et al.*, 1995).

Les variacions en la glicosilació observades en tipus cel·lulars diferents de les cèl·lules endotelials suggereixen que la funció que fa l'SSAO en aquest tipus de cèl·lules pot ser diferent (Jaakkola *et al.*, 1999) i són les responsables de les diferències de pes molecular aparent observades; en ratolí, el teixit adipós és el que presenta un major grau de glicosilació de l'SSAO (Bono *et al.*, 1999).

Es desconeix la molècula expressada als leucòcits a la que VAP-1 s'adhereix. El procés d'adhesió, però, és específic ja que no totes les poblacions de limfòcits (tan sols les cèl·lules T positives per CD8 i CD16, i no els monòcits, les cèl·lules B i les cèl·lules ajudants T) s'adhereixen a les cèl·lules endotelials que expressen VAP-1 (Salmi *et al.*, 1997). S'ha suggerit

que el lligand de VAP-1 pot ser activat via CD44 ja que la unió de CD44 a limfòcits augmenta l'adhesió dependent de VAP-1 d'aquests (Salmi *et al.*, 2000)

Estudis de transfecció de VAP-1 van demostrar que, tot i que contribueixen en la cascada d'adhesió, VAP-1 sola no és suficient per produir l'adhesió dels limfòcits a les cèl·lules endotelials. Així, la transfecció de VAP-1 en cèl·lules endotelials que no adhereixen limfòcits però que expressen altres proteïnes d'adhesió, provoca l'adquisició de la capacitat d'adhesió, però la transfecció en un model cel·lular diferent de cèl·lules endotelials, on no s'expressen altres proteïnes d'adhesió, no comporta l'adquisició de la capacitat d'adherir limfòcits (Salmi *et al.*, 2000).

2.2.1.2. FUNCIÓ D'ADHESIÓ I ACTIVITAT ENZIMÀTICA

Estudis recents han demostrat que l'activitat enzimàtica d'SSAO és necessària per a la funció d'adhesió (Salmi *et al.*, 2001), el tractament de cèl·lules endotelials amb semicarbazida disminueix el *rolling* dels limfòcits en un 50%. A més a més, aquests estudis demostren que és l'activitat enzimàtica *per se* la responsable d'aquest efecte i no els productes de la reacció. Així, mentre que l'addició de peròxid d'hidrogen (H_2O_2) o de l'aldehid producte de la reacció (benzaldehid) no modifiquen l'adhesió dels limfòcits, l'addició d'un substrat com ara la benzilamina la inhibeixen. Aquests resultats suggereixen que el substrat de VAP-1 podria ser una molècula de la superfície dels limfòcits i no pas una amina soluble.

En aquest sentit, s'ha postulat que un pèptid sintètic podria entrar al canal de la superfície de VAP-1 que porta al centre catalític (figura 21 A) (Salmi *et al.*, 2001). Seria possible, doncs, que amines de la superfície dels limfòcits, com ara aminosucres, cadenes laterals d'aminoàcids que contenen grups NH_2 (lisina o arginina) o residus N-terminals de les proteïnes, fossin els responsables d'una interacció covalent transitòria entre el limfòcit i la cèl·lula endotelial (figura 21 B). Aquesta hipòtesi explica perquè l'addició externa d'un substrat o inhibidor disminuieix l'adhesió entre el limfòcit i la cèl·lula endotelial, ja que es produeix un procés de competència.

Totes aquestes dades suggereixen que la dualitat de funció de l'enzim és important en el procés d'extravasació dels limfòcits. S'una banda, els limfòcits s'adhereixen via la funció d'adhesió en què estan implicats els àcids siàlics i tot seguit s'utilitza la reacció enzimàtica per produir un enllaç covalent transitori (base de Schiff, pas 3, figura 19) entre les cèl·lules que interactuen; així, el procés d'adhesió de VAP-1 pot ser bloquejat independentment per anticossos, eliminant els àcids siàlics i per inhibidors químics d'SSAO. La contribució de la funció enzimàtica permet que el procés d'extravasació dels leucòcits als teixits inflamats es pugui controlar de manera ràpida (revisat a Jalkanen and Salmi, 2001).

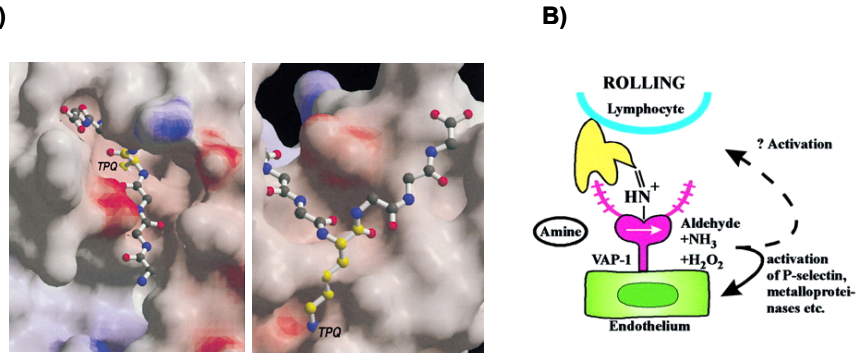


Figura 21. Els residus de lisina poden ser substrats de l'SSAO. A: Disseny molecular del pèptid (GGGKGGG) substrat de SSAO en el canal que porta al centre actiu. Els àtoms Cα de la lisina estan en groc. Les càrregues de la superfície del canal estan en blau si són positives, en vermell les negatives i en blanc les neutres. (Salmi et al., 2001) **B:** Interaccions entre VAP-1 de la cèl·lula endotelial i el limfòcit. Les modificacions oligosacàrides de VAP-1(extensions liles) poden unir-se a una molècula desconeguda *lectin-like* del limfòcit (groc). Alternativament, el VAP-1 endotelial utilitza una amina de la superfície del limfòcit com a substrat i es forma una enllaç covalent transitori entre totes dues cèl·lules (base de Shiff), l'amina present al limfòcit pot ser la mateixa molècula *lectin-like* o una de diferent. (Jalkanen and Salmi, 2001).

Tots aquests resultats mostren que la funció d'adhesió de VAP-1 està regulada com a mínim de tres maneres diferents:

- A les cèl·lules endotelials VAP-1 es troba en gränuls intracel·lulars i tan sols durant el procés d'inflamació es transloca a la membrana (assoleix la màxima expressió al cap de 8 hores) (Jaakkola *et al.*, 2000).
- La presència de VAP-1 sola no és suficient per a l'adhesió dels limfòcits, de manera que cal la inducció o activació d'altres proteïnes d'adhesió (Salmi *et al.*, 2000) perquè es produeixi la cascada d'extravasació.
- El lligand de VAP-1 als limfòcits tan sols es troba en algunes subpoblacions de limfòcits (Salmi *et al.*, 1997); així, només els leucòcits necessaris arribaran als teixits inflamats.

A més a més, aquests processos de regulació estan interrelacionats ja que el peròxid d'hidrogen indueix l'expressió de molècules d'adhesió com ara la P-selectina (Cheng *et al.*, 1998); ja que aquest es produeix durant la reacció enzimàtica de VAP-1/SSAO, aquesta contribució pot formar part d'aquest complex mecanisme de regulació.

2.2.2. SSAO I TEIXIT ADIPÓS: EFECTES INSULINOMIMÈTICS

2.2.2.1. EXPRESSIÓ D'SSAO A LA CÈL·LULA ADIPOSA

L'any 1984 Barran i Callingham (Barrand and Callingham, 1984) van descriure l'expressió d'SSAO al teixit adipós blanc. En els adipòcits de rata hi ha una alta activitat SSAO (Raimondi *et al.*, 1991) i la seva quantificació indica que hi ha 14 x 10^6 còpies per cèl·lula (Morris *et al.*, 1997). S'ha demostrat que l'SSAO no s'expressa en fibroblast 3T3-L1 o 3T3-F442A i que la seva expressió s'indueix durant la diferenciació adipocitària (Fontana *et al.*, 2001; Moldes *et al.*, 1999) (figura 22 A); aquesta observació concorda amb observacions prèvies, que havien detectat un augment en l'activitat SSAO en els preadipòcits obtinguts a partir de l'estroma vascular del teixit adipós de rata quan es diferencien a adipòcits *in vitro* (Raimondi *et al.*, 1990). Aquest conjunt de dades suggereix que SSAO és un membre del programa adipogènic i que pot contribuir a l'adquisició del fenotip dels adipòcits diferenciats.

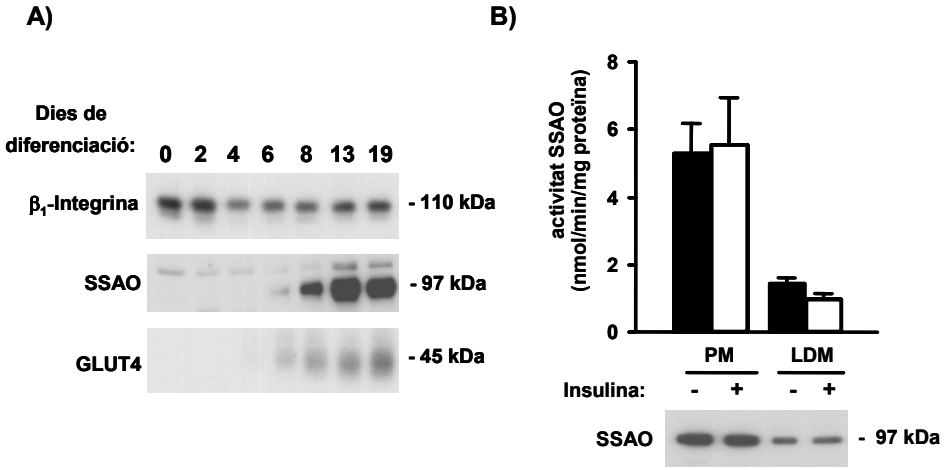


Figura 22. Expressió de SSAO en la membrana d'adipòcits 3T3-L1 durant la diferenciació. A: Patró d'aparició de l'SSAO i GLUT4 durant la diferenciació d'adipòcits 3T3-L1, la β1-integrina s'usa com a control de càrrega. **B:** Activitat i presència de proteïna en la membrana plasmàtica (PM) i en vesícules intracel·lulars (LDM) bovines en presència i absència d'insulina. (Resultats obtinguts per la Dra. Enrique-Tarancón).

La majoria de l'SSAO que s'expressa als adipòcits de rata es troba a la membrana plasmàtica (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1997). Així, el fraccionament subcel·lular d'adipòcits 3T3-L1 i adipòcits aïllats de rata va demostrar que SSAO és molt més abundant a la membrana plasmàtica (PM) que en microsomes lleugers (LDM) (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1997). A més a més, la distribució d'SSAO en el teixit adipós sembla que no està regulada hormonalment perquè la incubació dels adipòcits amb insulina no altera la quantitat de proteïna ni l'activitat SSAO a les membranes intracel·lulars o plasmàtica (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1997) (figura 22 B). La seva expressió i activitat, en canvi, estan disminuïdes per efectors de la via de senyalització de l'AMP cíclic, i per la citocina TNFα, ambdós implicats en el desenvolupament i el metabolisme del teixit

adipós (Moldes *et al.*, 1999).

L'SSAO colocalitza amb GLUT4 en vesícules intracel·lulars d'adipòcits (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1997). Tot i així, aquesta colocalització és parcial i només entre un 18 i un 24% de la totalitat intracel·lular de l'SSAO està en les vesícules de GLUT4 (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998). El GLUT4 intracel·lular pot trobar-se en un compartiment endosomal o en el compartiment exocitòtic (Livingstone *et al.*, 1996; Sevilla *et al.*, 1997), sembla que SSAO només colocalitza amb el GLUT4 del compartiment endosomal (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998) i no en un compartiment d'emmagatzematge específic.

2.2.2.2. SSAO I TRANSPORT DE GLUCOSA EN ADIPÒCITS

S'ha descrit la implicació de l'SSAO en l'estimulació del transport de glucosa en adipòcits aïllats de rata. La benzilamina, un substrat sintètic de l'SSAO, i la tiramina, un substrat endogen tant de l'SSAO com de la MAO, en presència de baixes concentracions de vanadat, inefectives per elles mateixes, estimulen el transport de glucosa fins un 70-80% de l'efecte màxim de la insulina (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998). Com que els efectes observats són sensibles a la semicarbazida i a la catalasa es proposa que les amines estimulen el transport de glucosa per via d'un mecanisme dependent de la producció de peròxid d'hidrogen el qual actuaria en sinergisme amb el vanadat (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998). Recentment, s'ha descrit que el tractament d'adipòcits 3T3-L1 amb TNFα a més a més de disminuir l'expressió i l'activitat d'SSAO, provoca una disminució del transport de glucosa estimulat tant per insulina com per la combinació de benzilamina i vanadat (Mercier *et al.*, 2003).

Els efectes estimuladors dels substrats de l'SSAO sobre el transport de glucosa també s'observen en adipòcits aïllats humans i en adipòcits 3T3-L1 i 3T3-F442A (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Fontana *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2001) i amb altres substrats de l'SSAO com la metilamina, la *N*-decilamina, la β-feniletilamina, la histamina, la *N*-acetilputrescina i la triptamina (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 2001). Aquestes dades reforcen la idea que l'SSAO estimula el transport de glucosa com a conseqüència de la producció de peròxid d'hidrogen més que com a conseqüència de l'aldehid produït. En el cas dels adipòcits 3T3-L1, tal com passa amb els adipòcits aïllats de rata, les estimulacions del transport de glucosa requereixen la presència de 0,1 mM de vanadat (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998), en els adipòcits aïllats humans i en els adipòcits 3T3-F442A; en canvi, es pot estimular el transport de glucosa en absència de vanadat (Fontana *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2001).

Respecte el mecanisme involucrat, s'observa que la combinació de benzilamina i vanadat o de tiramina i vanadat causa un augment de la quantitat de GLUT4 a la membrana plasmàtica causat per una translocació des del compartiment intracel·lular, com en el cas de l'estimulació per la insulina (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998).

La combinació de benzilamina i vanadat administrada *in vivo* també estimula el transport de glucosa en adipòcits. Aquests estudis formen part del treball fet en aquesta tesi i es descriuen detalladament a l'apartat dels resultats. Els efectes *in vivo* no són exclusius de la benzilamina ja que la tiramina, en aquest cas en absència de vanadat, també incrementa el transport de glucosa en teixits sensibles a la insulina quan s'administra a rates diabètiques per estreptozotocina (Morin *et al.*, 2002).

En adipòcits, els substrats de l'SSAO poden mimetitzar accions de la insulina diferents de l'estimulació del transport de glucosa. En aquest sentit, s'han descrit efectes antilipolítics de la benzilamina i la metilamina en presència de vanadat sobre adipòcits humans (Morin *et al.*, 2001) i de rata (Visentin *et al.*, 2003), efectes d'estimulació de la lipogènesi (Carpene *et al.*, 2001) i efectes sobre la diferenciació adipocitària que es detallen a l'apartat següent.

2.2.2.3. SSAO I DIFERENCIACIÓ ADIPOCITÀRIA

Un altre efecte de la insulina en adipòcits és l'estimulació de la diferenciació de preadipòcits a adipòcits. Per determinar els efectes dels substrats de l'SSAO sobre la diferenciació adipocitària es van tractar fibroblast 3T3-F442A amb benzilamina o tiramina durant una setmana; el tractament causa l'adquisició del fenotip adipocitari determinat per l'aparició de diferents marcadors, l'acumulació de triacilglicerol i l'aparició de sensibilitat a la insulina (Fontana *et al.*, 2001). Així mateix, el tractament de fibroblast 3T3-L1 amb metilamina també causa la diferenciació a adipòcits en un procés dependent del temps i de la dosi (Mercier *et al.*, 2001).

El efectes observats depenen de l'activitat SSAO i de la producció de H_2O_2 i poden ser additius als efectes adipogènics de la insulina. Aquests estudis impliquen a l'SSAO directament en el procés de diferenciació i desenvolupament del teixit adipós (Mercier *et al.*, 2001).

2.2.3. SSAO EN ALTRES TIPUS CEL·LULARS

L'SSAO s'expressa a tots els tipus de cèl·lules musculars llises, en aquest teixit, tal com passa a la cèl·lula adiposa, la seva expressió no està induïda per inflamació i no adhereix limfòcits, però sí que és capaç de desaminar amines primàries (Jaakkola *et al.*, 1999).

A les cèl·lules vasculars musculars llises derivades d'aorta de rata l'SSAO apareix durant la diferenciació; els nivells de proteïna i l'activitat apareixen simultàniament a altres marcadors de diferenciació de cèl·lules musculars llises (El Hadri *et al.*, 2002). A més a més, la metilamina, la β-feniletilamina i la tiramina són capaces d'estimular el transport de glucosa en aquestes cèl·lules de manera dependent del temps i de la dosi, i amb dependència de l'activitat SSAO i

de la producció de peròxid d'hidrogen. L'estimulació del transport de glucosa va acompanyada per un augment del transportador de glucosa GLUT1 a la membrana de les cèl·lules (El Hadri *et al.*, 2002).

2.3. IMPLICACIONS PATOLÒGIQUES DE L'SSAO

Les SSAO s'han implicat en diverses patologies bé com a causa o com a conseqüència. En aquest sentit, poc es coneix de la forma de membrana i els diferents estudis s'han focalitzat en l'SSAO circulant ja que es troba augmentada en situació de diabetis (Boomsma *et al.*, 1995a; Garpenstrand *et al.*, 1999; Hayes and Clarke, 1990; Nilsson *et al.*, 1968), en obesitat (Meszaros *et al.*, 1999), en patologies cardiovasculars com ara l'infart de miocardi (Boomsma *et al.*, 1997), en patologies hepàtiques cròniques (Kurkijarvi *et al.*, 1998; McEwen and Castell, 1967) i en malalties renals (Kurkijarvi *et al.*, 2001). A continuació es descriu breument el paper de l'SSAO en el teixit vascular i en fenòmens de creixement cel·lular.

2.3.1. EFECTES DE L'SSAO SOBRE EL TEIXIT VASCULAR

Diversos autors han relacionat a l'SSAO en la formació de la placa aterogènica i en el desenvolupament d'arteriosclerosi; ara bé, no hi ha cap demostració directa de la implicació de l'SSAO en el procés aterogènic. Les evidències que han portat a implicar l'SSAO en les malalties cardiovasculars es descriuen a continuació.

D'una banda, i com ja s'ha comentat, s'ha descrit un augment de la forma soluble de l'SSAO en la diabetis *mellitus* de tipus 1(Boomsma *et al.*, 1995a; Hayes and Clarke, 1990; Meszaros *et al.*, 1999) i de tipus 2 (Garpenstrand *et al.*, 1999; Salmi *et al.*, 2002). A més a més, s'ha observat una correlació entre l'activitat de l'SSAO plasmàtica i els nivells d'hemoglobina glicada (Boomsma *et al.*, 1995b) i un augment de formaldehid i metilglioxal, productes de l'oxidació de la metilamina i l'aminoacetona, possibles substrats endògens de l'SSAO, en l'orina de pacients diabètics (Deng and Yu, 1999). Així mateix, és conegut que la diabetis està associada a diversos problemes vasculars com l'arteriosclerosi i la retinopatia (Garpenstrand *et al.*, 1999) i nefropatia diabètiques (Boomsma *et al.*, 1995b).

D'altra banda, el formaldehid i el metilglioxal presenten una toxicitat més elevada que les amines de les quals deriven (revisat a Yu, 1998). Així, la incubació de cèl·lules endotelials *in vitro* amb metilamina presenta efectes tòxics en presència d'SSAO i aquests efectes es bloquegen utilitzant inhibidors de l'SSAO (Yu and Zuo, 1993). L'administració *in vivo* de metilamina a ratolins crea la formació d'adductes irreversibles en diversos teixits (Yu and Zuo, 1996), i l'administració crònica de metilamina en rates augmenta l'excreció de malondialdehid, un producte terminal de la peroxidació lipídica, (Deng *et al.*, 1998). Els efectes *in vivo* també depenen de l'activitat SSAO ja que disminueixen amb el tractament amb inhibidors de l'enzim

(Deng *et al.*, 1998; Yu and Zuo, 1996). El metilglioxal és citotòxic i indueix l'apoptosi en diferents tipus cel·lulars (Okado *et al.*, 1996); a través de la reacció de Maillard forma adductes estables amb proteïnes produint-se productes finals d'avançada glicació (AGE) (Monnier *et al.*, 1992) els quals han estat implicats en l'arteriosclerosi, la retinopatia i la nefropatia diabètiques (Brownlee, 1994). L'administració d'aminoacetona a rates augmenta la glicació de proteïnes en cèl·lules musculars llises de l'aorta (Mathys *et al.*, 2002). En aquest sentit, també s'ha descrit que les soques de ratolins més vulnerables a desenvolupar arteriosclerosi són aquelles que metabolitzen la metilamina més ràpidament per catàlisi de l'SSAO (Yu and Deng, 1998).

S'han fet estudis d'administració d'inhibidors de l'SSAO. Així, l'augment de lactat-deshidrogenasa, un marcador de nefropatia, en orina de rates diabètiques per estreptozotocina disminueix en administrar l'inhibidor de l'SSAO MDL-72974A (Yu and Zuo, 1997). L'aminoguanidina, un altre inhibidor de l'SSAO (Yu and Zuo, 1997) està implicat en la prevenció de glicació (Edelstein and Brownlee, 1992) i peroxidació lipídica *in vivo* (Bucala *et al.*, 1993) i s'ha utilitzat per prevenir la formació de la placa aterogènica en ratolins alimentats amb una dieta rica en colesterol (O'Brien *et al.*, 1992). Així mateix, l'administració d'MDL-72974A i aminoguanidina a ratolins diabètics KKAy causa un increment en la quantitat de metilamina a l'orina i una disminució de la quantitat de formaldehid, metilglioxal i malondialdehid (Yu *et al.*, 2002).

Així doncs, tot i que no s'ha demostrat directament la implicació de l'SSAO en el procés aterogènic, les diverses evidències obtingudes després de l'administració de substrats o inhibidors de l'enzim, juntament amb l'augment de l'activitat SSAO observat en diverses patologies, suggereixen que els productes de la reacció que catalitza podrien contribuir, via glicació i oxidació de proteïnes i lípids dels vasos sanguinis, la formació de la placa aterogènica. Aquestes hipòtesis, a més d'implicar l'SSAO en les patologies associades a la diabetis, també la impliquen en: *a*) l'angiopatia associada a situacions d'estrès (Yu *et al.*, 1997), ja que l'estrès augmenta l'alliberament d'adrenalina la qual es desamina per la MAO i forma metilamina; *b*) patologies cerebrovasculars com l'Alzeimer, ja que la metilamina es produeix a partir del metabolisme de l'adrenalina (Yu, 2001) i s'ha descrit un increment de l'SSAO en els vasos sanguinis del cervell d'aquests malalts (Ferrer *et al.*, 2002). Resta, però, per demostrar quines són les dosis que poden provocar aquest procés i en quines dosis els productes produïts podran actuar com a segons missatgers.

Hi ha altres evidències que relacionen l'SSAO amb la fisiologia del teixit vascular. Les cèl·lules vasculars llises, responsables de la producció d'elastina, expressen abundant SSAO (Lyles and Singh, 1985); la inhibició de l'SSAO provoca una desorganització severa de l'estructura d'elastina a l'aorta que condueix a lesions vasculars; aquesta observació suggereix un paper de l'SSAO en el desenvolupament i manteniment de la matriu del teixit connectiu (Langford *et al.*, 1999; Langford *et al.*, 2002). Aquestes lesions són semblants a les observades

per inhibició de la lisiloxidasa (Eyre *et al.*, 1984). D'altra banda, la metilamina, al contrari del que passa en les cèl·lules endotelials, només és tòxica a les cèl·lules musculars llises dels vasos a concentracions elevades (LC_{50} = 0,1 M) (Langford *et al.*, 2001); aquest autors proposen que l'SSAO no té cap paper en el dany de la metilamina sobre les cèl·lules musculars llises.

2.3.2. SSAO I CREIXEMENT CEL·LULAR

Existeixen diverses evidències de la implicació de l'SSAO en la proliferació cel·lular, i per tant, en la carcinogènesi. Les dades són, però, contradictòries. D'una banda, diferents poliamines com ara la putrescina, l'espermidina i l'espermina s'han associat a la proliferació cel·lular (Glikman *et al.*, 1990); i la histamina, una amina biogènica, està implicada en la proliferació de tumors (Bartholeyns and Bouclier, 1984). Atès que les poliamines són substrats de la forma bovina i que la histamina és substrat d'SSAO bovina, de rata i de ratolí, la seva degradació per l'SSAO pot ser considerada beneficiosa. En aquest sentit, s'ha observat una disminució de l'SSAO plasmàtica en pacients amb càncer (Lewinsohn, 1977) i una disminució de l'SSAO de membrana en càncer mamari en rates; en aquests animals la disminució d'SSAO es correlaciona positivament amb la malignitat del tumor (Lizcano *et al.*, 1991). A més a més, la forma de membrana ha estat implicada en la resposta antitumoral i s'ha proposat com a mitjancera de la unió de cèl·lules immunoterapèutiques a l'endoteli tumoral (Irjala *et al.*, 2001).

D'altra banda els aldehids i el peròxid d'hidrogen produïts per la reacció enzimàtica catalitzada per SSAO s'han considerat efectors tumorals i s'han descrit disminucions de l'enzim destoxificant d'aldehids, l'aldehid deshidrogenasa, en pacients amb càncer de pròstata (Ryzlak *et al.*, 1992). S'han descrit també increments en l'SSAO circulant en pacients amb càncer de pròstata i metàstasi muscular (Ekblom *et al.*, 1999).

Així doncs, en resum, sembla que l'SSAO té un paper protector davant de concentracions patològiques d'amines biogèniques i que podria ser un inductor potencial del dany cel·lular a través dels

II. OBJECTIUS

El teixit adipós blanc, tot i no formar part del grup de teixits encàrregats en l'aclariment d'amines endògenes o exògenes, com són el cervell, el fetge, el ronyó, el pulmó o l'intestí, presenta una activitat amino-oxidasa elevada. Aquesta activitat és deguda a la presència de dues isoformes de l'enzim MAO, MAO A i MAO B (Marti *et al.*, 1998; Pizzinat *et al.*, 1999b), que es troben majoritàriament a la fracció mitocondrial i a l'SSAO (Raimondi *et al.*, 1992; Raimondi *et al.*, 1991), localitzada a la membrana plasmàtica. El teixit adipós blanc, el teixit més rellevant a l'organisme en termes d'emmagatzematge d'energia, és un regulador important de l'homeòstasi glucídica a l'organisme ja que, juntament amb el múscul esquelètic i el múscul cardíac, és un dels teixits anomenats *sensibles a la insulina*. Aquests teixits es caracteritzen perquè presenten el transportador de glucosa GLUT4, que és capaç de translocar-se a la membrana de la cèl·lula en resposta a la insulina ràpidament, de manera que s'estimula la captació tissular de glucosa.

El tractament de la diabetis *mellitus* és un tema no resolt. Actualment, la insulina és el principal fàrmac utilitzat per tractar la diabetis de tipus 1 i, en alguns casos, la diabetis de tipus 2. La seva administració presenta, però, alguns inconvenients: no és fàcil aconseguir una normoglucèmia estable, només es pot administrar per via parenteral i no és efectiva en tots els casos, ja que la resistència cel·lular a la insulina implica que s'ha d'augmentar progressivament la dosi per mantenir els efectes terapèutics.

En la cerca de diferents compostos que puguin actuar com a substituts de la insulina, s'han descrit accions insulinomimètiques de diferents compostos metàl·lics com són el vanadat (Heyliger *et al.*, 1985), el tungstat (Goto *et al.*, 1992), el selenat (McNeill *et al.*, 1991), i el liti (Bosch *et al.*, 1992). Així, el grup en què s'ha desenvolupat aquesta tesi fa anys que treballa en la cerca de molècules moduladores i/o mimetitzadores de l'acció de la insulina amb un potencial efecte terapèutic, així com en l'estudi de les propietats insulinomimètiques que poden derivar-se de l'activitat catalítica de l'enzim SSAO.

D'altra banda, no ens podem oblidar de la sorprenent nova direcció que va prendre la recerca relacionada amb l'SSAO quan l'any 1998, poc abans de l'inici d'aquesta tesi doctoral, es va descobrir que la proteïna d'adhesió vascular-1 (VAP-1) era, de fet, idèntica a l'SSAO (Bono *et al.*, 1998a). Així doncs, l'SSAO/VAP-1 és una proteïna amb una dualitat de funció; d'una banda, presenta activitat enzimàtica amino-oxidasa i, de l'altra, presenta propietats d'adhesió que la impliquen en l'extravasació de limfòcits en processos inflamatoris.

Els darrers anys, s'ha passat de considerar el teixit adipós com un òrgan d'emmagatzematge energètic a considerar-lo un teixit de vital importància per al control del metabolisme glucídic de l'organisme (Abel *et al.*, 2001), ja que sintetitza i segrega molècules reguladores com són la leptina, l'adiponectina o la resistina; i, per tant, està fortament implicat en la patologia diabètica (Ahima and Flier, 2000). El transport de glucosa al teixit adipós i al

múscul esquelètic és un pas limitant en l'ús de glucosa i la resistència a la insulina es manifesta en una disminució de la capacitat de la insulina per estimular el transport de glucosa en aquests teixits. Amb la intenció d'avaluar el possible paper fisiològic de l'abundància d'SSAO al teixit adipós, treballs previs d'aquest grup de recerca havien demostrat que substrats de l'SSAO en combinació amb vanadat podien estimular el transport de glucosa per via de l'estimulació de la translocació dels transportadors de glucosa GLUT4 a la membrana de la cèl·lula en adipòcits aïllats de rata (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998).

En el moment de començar aquesta tesi, s'estava treballant en el mecanisme molecular d'acció de la benzilamina i del vanadat en cèl·lules adiposes. Així doncs, el primer objectiu d'aquest treball va ser:

1. Aprofundir en l'estudi del mecanisme molecular d'acció de la combinació de benzilamina i vanadat a les cèl·lules adiposes i en la determinació de la molècula activa generada responsable dels efectes observats després de la catàlisi de l'SSAO en presència de vanadat.

Un cop demostrat l'efecte insulinomimètic de la combinació de benzilamina i vanadat sobre cèl·lules adiposes, calia passar a estudis *in vivo* en models animals; així els següents objectius que ens vam plantejar van ser:

2. Estudiar l'efecte de l'administració aguda o crònica de la combinació de benzilamina i vanadat sobre animals no diabètics i en models de diabetis de tipus 1 i tipus 2.

3. Estudiar l'efecte del tractament crònic amb benzilamina i vanadat sobre el metabolisme del teixit adipós i del múscul esquelètic, així com sobre l'activitat dels illots pancreàtics.

Atesa la importància del teixit adipós en la patologia diabètica (Ahima and Flier, 2000), l'elevada activitat SSAO present en aquest teixit (Raimondi *et al.*, 1990) i el fet que l'activitat SSAO present en el plasma està augmentada en la diabetis *mellitus* (Nilsson *et al.*, 1968), un altre objectiu d'aquesta tesi va ser:

Analitzar la participació del teixit adipós en l'alliberament de la forma soluble de l'SSAO/VAP-1.

III. MATERIALS I MÈTODES

1. ANIMALS

Els animals que s'han fet servir en aquesta tesi procedien de cases comercials autoritzades i van restar a l'estabulari de la Facultat de Biologia fins al moment que van ser utilitzats.

En general, i sempre que no s'especifiqui, els animals utilitzats han estat mascles de 180-220 g, alimentats *ad libitum* amb pinso de tipus A04 de la casa Panlab i mantinguts en unes condicions d'estabulació controlades automàticament: temperatura de 22 ± 1ºC, humitat relativa 80-90%, cicles de llum/foscor de 12 hores cadascun.

Tots els protocols utilitzats han estat prèviament autoritzats pel Comitè Etic de la Universitat de Barcelona.

1.1. GRUPS EXPERIMENTALS

1.1.1. ANIMALS CONTROLS NO DIABÈTICS

S'han utilitzat rates albines (*Rattus norvegicus*) de raça *Wistar* comprades a Harlan (Interfauna Ibèrica SA),

1.1.2. MODEL ANIMAL DE DIABETIS *MELLITUS* DE TIPUS 1

La diabetis *mellitus* ha estat induïda a rates *Wistar* mascle per administració d'estreptozotocina (STZ). S'ha dissolt l'STZ en tampó citrat sòdic 50 mM, pH 4,5 (apèndix I), mantingut a 4ºC, just abans de ser utilitzada i s'ha injectat intraperitonealment a una dosi de 45 o 70 mg/kg de pes corporal (en un volum de 300 μl / 200 g), dependent del grau de diabetis desitjat, una setmana abans del dia d'experimentació. Per estar segurs de l'eficàcia del tractament amb STZ s'ha controlat la glucèmia dels animals dos dies després de la injecció i en cas de no observar un augment en la glucèmia aquesta s'ha repetit. Només s'han utilitzat animals amb glucèmies superiors a 300 mg/dl.

1.1.3. MODEL ANIMAL DE DIABETIS *MELLITUS* DE TIPUS 2

S'han utilitzat rates mascle Goto-Kakizaki comprades a *M&B Animal Models* (Dinamarca), del mateix pes que les rates *Wistar*; 180-200 g corresponent a 6-7 setmanes d'edat.

Es tracta d'un model de diabetis de tipus 2 obtingut a partir de rates *Wistar* i mitjançant la selecció i l'encreuament d'aquelles rates que presentaven una lleugera intolerància a la glucosa (> 10% d'intolerància). Aquests animals no obesos són hiperinsulinèmics i hiperglucèmics, i presenten secrecions d'insulina defectuoses i resistència dels teixits perifèrics a la insulina

(Kimura *et al.*, 1982; Krook *et al.*, 1997; Tsuura *et al.*, 1993).

1.1.4. ANIMALS AMB L'ACTIVITAT SSAO INHIBIDA

A fi d'inhibir l'activitat SSAO en rates s'administrà semicarbazida per injecció intraperitoneal a una dosi de 5 mg/kg/dia en NaCl 0,9% durant 3 dies consecutius. Estudis d'activitat en adipòcits aïllats procedents d'aquests animals han demostrat que l'activitat SSAO d'aquest teixit es troba completament inhibida (comunicació personal, Dra. Mercedes Unzeta).

1.2. ESTUDIS AMB ANIMALS

GRUPS EXPERIMENTALS

- Animals control que reben el vehicle PBS.
- Animals en què s'administra el fàrmac benzilamina (Sigma).
- Animals en què s'administra el fàrmac vanadat (Sigma).
- Animals en què s'administra la combinació benzilamina i vanadat.

1.2.1. ADMINISTRACIÓ AGUDA DE BENZILAMINA I VANADAT A RATES *WISTAR*

Una primera aproximació per avaluar si la combinació de benzilamina i vanadat pot presentar efectes insulinomimètics sobre la utilització de glucosa *in vivo*, ha estat administrar la combinació dels fàrmacs a rates *Wistar* no diabètiques i mirar si la seva glucèmia es veu modificada.

PROCEDIMENT

1. Rates *Wistar* en estat postabsortiu, aproximadament 4 hores de dejuni, s'anestesien per injecció intraperitoneal de pentobarbital sòdic (50-70 mg/kg de pes corporal).
2. S'administra als animals, per la vena de la cua, el vehicle PBS (apèndix I), vanadat (en dosis de 10 o 20 μmol/kg) i/o benzilamina (en dosis de 7 o 70 μmol/kg).
3. Passats 30 minuts de la injecció es fa un petit tall a l'extrem de la cua de l'animal i es recullen uns 200 μl de sang en tubs Eppendorf heparinitzats, es tracta d'una barreja de sang venosa i arterial.
4. Es prepara plasma per centrifugació de la sang recollida durant 10 minuts a 14.000 rpm i a 4ºC.
5. Es congela el plasma a -20ºC fins que es determinin les concentracions de glucosa i insulina.

Nota: per veure clarament la vena de la cua abans de les injeccions dels fàrmacs i per

extreure'n la sang amb facilitat s'escalfa la cua de l'animal durant aproximadament un minut amb aigua a 37-40ºC.

1.2.2. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA (TTG)

El test de tolerància a la glucosa és una tècnica emprada per avaluar la capacitat d'absorció de glucosa que un individu presenta. Així doncs, la tècnica es basa en l'administrarció d'una càrrega de glucosa i seguir la seva aparició i desaparició a la sang. En cas que es presenti resistència a la insulina s'arribarà a nivells de glucèmia en sang més elevats i es trigarà més temps a tornar a l'estat glucèmic basal. Una manera d'analitzar els resultats obtinguts és calcular l'àrea sota la corba obtinguda en el seguiment de la glucèmia durant el temps; si expressem els resultats d'aquesta manera, aquells individus que presenten resistència a la insulina tenen àrees sota la corba més grans. Per avaluar si la combinació de fàrmacs usada és capaç de millorar la tolerància a la glucosa, s'han fet estudis tant en animals no diabètics com en animals diabètics de tipus 1 i de tipus 2; el protocol seguit ha estat diferent en tots dos casos: així el protocol seguit amb els animals no diabètics es troba explicat com el protocol A i el seguit amb els animals diabètics, com el B. El protocol C detalla el TTG realitzat en animals no diabètics amb l'objectiu de determinar les variacions en la concentració de glucosa a l'orina, glucosúria, després d'haver administrat benzilamina i vanadat.

MATERIALS

- Agulles de 30 G per a l'administració de glucosa per la vena safena
- Sonda gàstrica (18 G, 50 mm, extrem rodó) per a l'administració oral de glucosa (Finetools)
- Florizina (Sigma)

PROCEDIMENT A: TTG a rates no diabètiques

1. S'anestesien els animals per injecció intraperitoneal de pentobarbital (50-70 mg/kg de pes corporal).
2. Se'ls administra els fàrmacs per la vena de la cua, (20 μmol/kg de vanadat i/o 7 μmol/kg de benzilamina).
3. Després de 30 minuts es realitza un petit tall a l'extrem de la cua a fi de poder recollir sang (temps 0).
4. Tot seguit s'administra glucosa (0,8 g/kg) per la vena safena. Abans d'administrar glucosa, cal obrir la pell de l'animal que cobreix la zona de la cama on es troba la vena safena per tal que aquesta quedi visible.
5. Es prenen mostres de sang a temps 5, 10, 15, 20, 30 i 45 minuts després d'haver administrat glucosa. Cada vegada que s'extreu sang dels animals cal enretirar el petit

coàgul que s'ha format a l'extrem de la cua; no cal, doncs, tallar la cua cada vegada.

Nota: la sang es recull en tubs Eppendorf heparinitzats, uns 200 μl cada vegada, i es processa com s'ha descrit anteriorment.

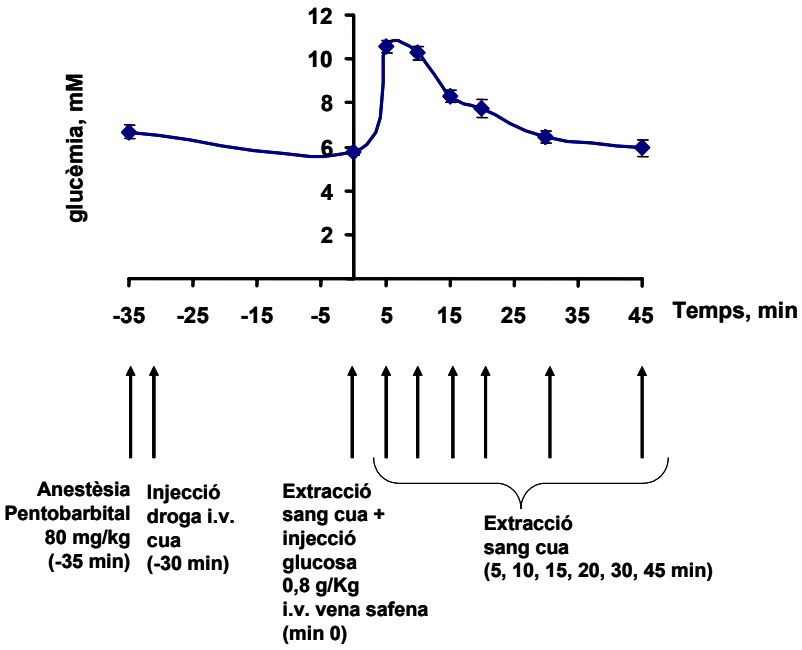


Figura 1. Protocol del test de tolerància a la glucosa realitzat en rates no diabètiques.

PROCEDIMENT B: TTG a rates diabètiques

1. A les 8 del matí del dia de l'experiment es retira l'aliment dels animals per tal d'assegurar 3-4 hores de dejuni abans de començar l'estudi. En general els rosegadors no mengen durant el dia; així doncs, la retirada del menjar no provoca estrès i d'aquesta manera ens assegurem que estan en estat postabsortiu.
2. Un cop dilatada la vena de la cua dels animals per escalfament en aigua a 37-40ºC, s'introdueixen en un immobilitzador i se'ls administra fàrmacs per la vena de la cua. En aquest cas els animals no estan anestesiats i és per això que cal fer servir l'immobilitzador. L'immobilitzador no suposa cap estrès per als animals, ja que hi entren amb facilitat. Durant l'administració del fàrmac s'embolica l'immobilitzador amb un drap de manera que l'animal està a les fosques i es tranquil·litza. Un cop acabada la injecció es torna l'animal a la seva gàbia.
3. Quinze minuts després d'haver administrat els fàrmacs, es pren una mostra de sang per la vena de la cua i es realitza una càrrega oral de glucosa (2 g/kg de pes corporal) mitjançant una sonda gàstrica.
4. Es recullen mostres de sang 15, 30, 45, 60 i 90 minuts després de la càrrega de glucosa.

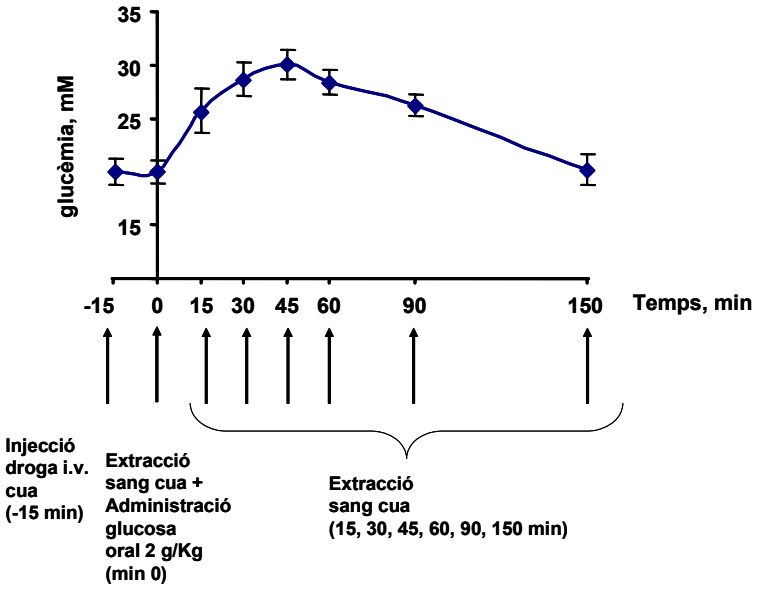


Figura 2. Protocol del test de tolerància a la glucosa realitzat en rates diabètiques de tipus 1 i tipus 2.

PROCEDIMENT C: TTG per a la determinació de la glucosúria

Aquest experiment pretén demostrar que la millora en la tolerància a la glucosa observada una vegada s'ha administrat benzilamina i vanadat no és deguda a una excreció augmentada de glucosa en orina. Hi ha alguns fàrmacs, com ara la florizina, usada en aquest experiment com a control, que provoquen una reducció en la glucèmia augmentant l'excreció de glucosa per orina.

El protocol de TTG seguit és el protocol B encara que les rates usades no són diabètiques. La florizina (diluïda en NaOH 1N) s'administra intraperitonealment a una dosi de 300 mg/kg de pes corporal, al mateix temps que la resta de drogues.

Els animals es mantenen dins una gàbia metabòlica per poder recollir l'orina. Per evitar que l'estrès que provoca la gàbia metabòlica interfereixi en els resultats obtinguts els animals es col·loquen dins les gàbies metabòliques dos dies abans de realitzar el TTG.

Les mesures de glucosúria es realitzen en l'orina recollida durant dues hores abans i durant dues hores després de l'administració de glucosa. Les mesures de glucèmia realitzades durant el TTG serveixen per controlar que tant la benzilamina i el vanadat com la florizina estan actuant.

Les orines recollides es guarden a 4ºC fins a la mesura de la glucosa, que es fa en paral·lel a les mesures en plasma.

1.2.3. TRACTAMENTS CRÒNICS DE RATES DIABÈTIQUES

Un cop comprovat que la combinació de fàrmacs és efectiva de manera aguda *in vivo* s'ha estudiat si aquesta podria ser utilitzada per normalitzar la glucèmia d'animals diabètics de tipus 1 i tipus 2. S'han tractat els animals durant dues setmanes amb la combinació de fàrmacs, temps durant el qual s'ha seguit la glucèmia d'aquests animals diàriament, en el cas dels animals diabètics de tipus 1 també s'hi ha controlat el consum de menjar i beguda i les variacions de pes. La insulinèmia dels animals ha estat mesurada en el plasma, recollit a l'inici i al final del tractament. Per a l'administració dels fàrmacs s'han fet servir dues vies diferents. En el cas de la benzilamina (84 μmol/kg/dia), aquesta s'administra en minibombes osmòtiques implantades subcutàniament que la van alliberant de manera contínua a una velocitat de 0,5 μl/h. El vanadat (25 o 50 μmol/kg/dia) s'administra diàriament mitjançant una injecció intraperitoneal a les 9 del matí, just després d'haver mesurat diàriament la glucèmia.

MATERIALS

Tot el material utilitzat ha d'estar prèviament esterilitzat per filtració o amb l'autoclau a fi d'evitar infeccions.

- Minibombes osmòtiques Alzet® model 2002 ML (Alza Corporation, USA)
- Anestèsic ketamina (Imalgène, Mérieux, França)
- Analgèsic xilazina HCl (Sigma), necessari perquè els animals es recuperin després del procediment quirúrgic.
- Antibiòtic en pols Azol (Roche)

PROCEDIMENT

Preparació de les bombes:

1. Es pesen els animals per a poder calcular la concentració de benzilamina amb la qual s'han d'omplir les bombes, de manera que cada animal rebi la dosi establerta.
2. S'omplen les bombes amb la solució corresponent.
3. S'activen les bombes durant un mínim de dues hores submergides en una solució de salí a 37ºC. Aquestes alliberaran la solució que contenen de manera contínua durant 14 dies a un flux de 0,5 μl/h.

Càlculs per omplir les bombes:

Es prepara una solució mare de benzilamina, que es filtra. Aquesta es prepara més concentrada del que es necessita per a la dosi desitjada; així, si es vol administrar una dosi de 84 μmol/kg/dia es calcula la concentració de la solució que s'hauria de preparar per a una rata amb un pes superior al pes de les que tenim, tenint en compte el flux de la bomba. El que es fa després és calcular el factor de dilució que s'ha d'aplicar, y, per al pes de cadascuna de les rates (dividint el pes pel qual s'ha calculat la solució mare pel pes real, x). y = x – 1, sent y els μl que cal afegir a 1 ml de la solució de benzilamina mare per tenir la dosi corresponent a aquella rata.

Vegem-ho amb un exemple: si preparem una solució mare per a una rata de 280 g, però la nostra rata és de 248 g, i per a una bomba amb un flux de 0,52 μl/hora.

- 84 μmol benz = 12 mg benz
- la solució mare per a la rata de 280 g: 12 mg/kg/dia = 0,14 mg/hora = 269,2 mg/ml
- per a la rata de 248 g: x = 280/248 = 1,129, y = 1,129 - 1 = 129, és a dir, cal afegir 129 μl a 1 ml de la solució mare

Procediment quirúrgic:

1. S'anestesien els animals usant una barreja de ketamina (90 mg/kg) i xilazina (10 mg/kg) administrada intraperitonealment.
2. Es ruixa el pèl dels animals de la zona de l'esquena prop del coll amb alcohol, s'elimina amb una esquiladora i es realitza un tall aproximadament d'un centímetre. Amb l'ajut d'unes tisores de punta rodona es crea un espai entre la pell i la massa muscular.
3. S'introdueix la bomba prèviament omplerta i activada. En els animals control no s'introdueix la bomba però es realitza el mateix procediment quirúrgic.
4. Es posa l'antibiòtic Azol en pols a la zona del tall, i es cus l'obertura.
5. L'animal es deixa a la gàbia perquè es recuperi.
6. El dia de la implantació de les bombes i el darrer dia del tractament es recull sang de la cua de les rates i es prepara plasma per fer determinacions d'insulina. Durant les dues setmanes de tractament la glucèmia es determina directament a partir d'una gota de sang de la cua.
7. Se sacrifiquen els animals i es fan estudis *in vitro*.

1.2.4. ABLACIÓ DEL TEIXIT ADIPÒS

Amb l'objectiu de determinar si la proteïna SSAO que es troba a la circulació prové del teixit adipós, se n'elimina una part d'aquest en rates mascle *Wistar* i es determinen els nivells

de la proteïna circulant. Una sèrie d'animals es va sotmetre al procediment quirúrgic sense que se'ls eliminés el teixit: són els animals control.

MATERIALS

- Anestèsic isoflurà (Inibsa, laboratoris Rhodia)
- Analgèsic postoperatori buprenorfina (Buprex, Schering-Plough)

PROCEDIMENT

1. S'extreu sang per la vena safena (150 μl) i es prepara plasma.
2. S'anestesien els animals amb isofluorà al 2%.
3. S'obre la paret abdominal fent un tall de 2 cm.
4. S'extreu el teixit adipós blanc epididimal i perirenal de la meitat dels animals (3 ± 0,5 g).
5. Es cus la paret muscular, el teixit adipós subcutani i la pell de tots els animals.
6. S'administra buprenorfina per injecció subcutània cada 12 hores durant 48 hores a una dosi de 0,01-0,05 mg/kg
7. S'extreu sang al cap de 24, 48 i 72 hores i 7 dies després de l'operació, i es prepara plasma que es guarda a -20ºC fins a la determinació de l'activitat SSAO.

1.2.5. EXPLANTS HUMANS

El teixit adipós humà es va obtenir de teixit adipós subcutani abdominal de dones d'entre 28 i 64 anys i amb un índex de massa corporal d'entre 19 i 32 kg/m^2 sotmeses a operacions de cirurgia plàstica de dermolipectomia (Departament de Cirurgia Plàstica, Hospital Rangueil de Toulouse); les dones havien dejunat durant la nit i l'operació es va fer al matí amb anestèsia. El protocol tenia l'acceptació del Comitè Ètic de l'Hospital Universitari de Toulouse.

MATERIALS

- Flascons de poliestirè de 75 cm^2 (Falcon, Becton Dickinson, Meylan, France)
- Medi DMEM (Invitrogen)

PROCEDIMENT

1. S'elimina la pell i els vasos sanguinis de les mostres quirúrgiques, es renten una vegada amb PBS calent i es transfereixen a un ambient estèril.
2. Els dipòsits de greix es tallen en peces petites entre 100 i 400 mg i es posen en medi DMEM suplementat amb 5% de sèrum fetal boví, 200 U/ml de penicil·lina, 50 µg/ml

d'estreptomicina i 200 µg/ml de gentamicina.

3. Es distribueixen les peces de teixit adipós en flascons de poliestiré de manera que queden entre 6 i 9 g de teixit cada 25 ml de medi. Es mantenen els flascons a 37ºC en un incubador de CO_2 al 7%.
4. Al cap de 24 hores es canvia el medi dels explants per un medi DMEM sense sèrum i es tracten amb les molècules a testar.
5. Al cap de 48 hores es recull el medi, es centrifuga i es concentra com s'ha descrit al punt 3.4..

1.2.6. MÈTODES ANALÍTICS

- DETERMINACIÓ DE LA GLUCÈMIA I LA GLUCOSÚRIA

1. *MPR 3 Glucosa / mètode GOD-MAP* (kit Boehringer Mannheim, ref. 166 391)

El test es basa en la detecció, a una longitud d'ona de 492 nm, del producte acolorit format en la reacció:

$$\text{Glucosa} + O2 + H_2O \xrightarrow{GOD} \text{gluconat} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \text{4-aminofenazona} + \text{fenol} \xrightarrow{POD} \text{4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona} + 4\,H_2O$$

PROCEDIMENT

1. Es dilueix el plasma 1/10 o 1/20 en aigua. L'orina s'usa directament exceptuant-ne la recollida dels animals que han rebut una injecció de florizina, en què cal diluir-la 1/250 en aigua.
2. S'afegeixen, en plaques d'ELISA de 96 pous, 20 µl de plasma o orina i 180 µl de la solució del kit per duplicat de cada mostra.
3. S'incuba 30 minuts a 37ºC.
4. Es determina la formació de producte acolorit per lectura a 492 nm.
5. Per a cada placa cal un estàndard de concentracions de glucosa (0, 0,25, 0,5, 1, 2, i 3 mM per duplicat)

2. ACCUTREND

La glucèmia dels animals dels tractaments crònics s'ha determinat diàriament usant el lector de glucèmia *Accutrend Sensor Comfort* de Roche. Aquest permet detectar de la glucèmia sanguínia dipositant directament una gota de 4 μl sang, que és absorbida per capil·laritat en una tira d'un sol ús.

Diàriament es retira la crosta de sang de l'extrem de la cua dels animals i es diposita la gota de sang a la tira absorbent, al cap de 40 segons es pot llegir la glucèmia expressada en mg/dl.

- DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ D'INSULINA

Per determinar les concentracions d'insulina provinents de plasmes congelats s'ha usat el kit comercial *Sensitive Rat Insulin RIA Kit* (referència SRI-13K) de Linco Research Inc. (EUA).

- DETERMINACIÓ DE TRIGLICÈRIDS

Per determinar triglicèrids en plasma de rata s'ha utilitzat el kit comercial de BioSystems *enzimàtic-espectrofotomètric Glicerol Fosfat Oxidasa/ Peroxidasa*.

Els triglicèrids presents a la mostra originen, per les reaccions que es descriuen a continuació, un complex acolorit que es quantifica per espectrofotometria a 550 nm:

$$\text{Triglicèrids} + H_2O \xrightarrow{\text{lipasa}} \text{Glicerol} + \text{Àcids grassos}$$

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glicerol-quinasa}} \text{Glicerol-3-P} + \text{ADP}$$

$$\text{Glicerol-3-P} + O_2 \xrightarrow{\text{G3P-oxidasa}} \text{Dihidroxiacetona-P} + H_2O_2$$

$$2\ H_2O_2 + \text{4-Aminoantipirina} + \text{4-Clorofenol} \xrightarrow{\text{peroxidasa}} \text{Quinonaimina} + 4\ H_2O$$

MATERIALS

Reactiu del kit: Pipes 45 mM, 4-clorofenol 6 mM, clorur magnèsic 5 mM, lipasa > 100 U/ml, glicerol-quinasa > 1,5 U/ml, glicerol-3-fosfat oxidasa > 4 U/ml, peroxidasa > 0,8 U/ml, 4-aminoantipitina 0,75 mM, ATP 0,9 mM, a pH 7,5.

Patró triglicèrids: Glicerol 200 mg/dl

PROCEDIMENT

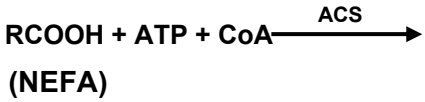
1. Es deixen temperar els reactius durant 2 minuts.
2. A cada pou d'una placa d'ELISA s'afegeixen 2,5 μl de plasma i 200 μl de reactiu. També cal un blanc on es posa H_2O en lloc de plasma i un punt patró (200 mg/dl) per cada placa.
3. S'incuba la placa a 37ºC durant 5 minuts.
4. Es llegeix l'absorbància a 550 nm.

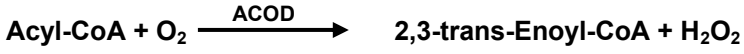
CÀLCULS

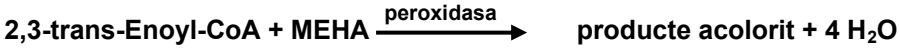
Abs mostres / Abs patró x 200 = mg triglicèrids / dl
mg triglicèrids / dl x 0,0113 = mM

- DETERMINACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS LLIURES O NO ESTERIFICATS

Per determinar àcids grassos lliures o no esterificats (FFA o NEFA) s'utilitza el kit *NEFA C mètode ACS-ACOD* de Wako, que es basa en l'aparició d'un producte acolorit a partir dels àcids grassos lliures presents a la mostra mitjançant les reaccions descrites:







SOLUCIONS

Reactiu A: 0,05 U/ml ACS (acilcoenzim A sintasa)
0,5 U/ml AOD (ascorbat oxidasa)
0,1 mg/ml CoA (coenzim A)
0,5 mg/ml ATP (adenosina trifosfat)
0,05 mg/dl 4-aminoantipirina
50 mM tampó fosfat pH 6,9
3 mM Mg_2Cl

Reactiu B: 1 U/ml ACOD
1,15 U/ml peroxidasa
1,2mM MEHA (3-methyl-n-ethyl-N-(β-hydroxyethyl)-anilide)

Solució estàndard: àcid oleic 1 mM

PROCEDIMENT

1. Es realitza la lectura en una placa d'ELISA i a cada pou s'afegeixen 5 μl de plasma, solució l'estàndard (1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 i 0,1 mM) i H_2O en el cas del blanc i 75 μl del reactiu A del kit.
2. S'incuba durant 10 minuts a 37ºC.
3. S'afegeixen 150 ml del reactiu B i s'incuba 10 minuts més a 37ºC.
4. Es llegeix l'absorbància a 550 nm.

2. ESTUDIS AMB TEIXITS DE RATA

Generalment, els animals han estat sacrificats per dislocació cervical abans de procedir a l'extracció dels teixits. Només en el cas de l'extracció de múscul *soleus* per al transport de glucosa s'ha mantingut els animals anestesiats durant l'extracció.

Els teixits extrets s'han processat directament o han estat congelats ràpidament en nitrogen líquid i mantinguts a –80ºC fins al dia del seu processament.

2.1. TEIXIT ADIPÓS BLANC

El teixit adipós utilitzat en aquesta tesi ha estat una barreja de teixit adipós blanc epididimal i perirenal.

2.1.1. AÏLLAMENT D'ADIPÒCITS DE RATA

La tècnica d'aïllament d'adipòcits de rata consisteix a disgregar el teixit adipós mitjançant una acció mecànica i una posterior digestió amb col·lagenasa per obtenir una suspensió d'adipòcits aïllats, que és el punt de partida de molts protocols que es detallen en aquesta tesi. S'han utilitzat adipòcits aïllats en els experiments de transport de 2-desoxiglucosa, obtenció d'extractes i de membranes totals d'adipòcits aïllats, tècniques d'immunocitoquímica i d'estat de fosforilació.

Sempre que es treballi amb adipòcits de rata, és important que el material utilitzat no sigui

de vidre, ja que els adipòcits es trenquen en posar-se en contacte amb aquest material.

MATERIALS

- bany a 37ºC amb agitació orbital
- xeringues de 20 ml
- catèter: *Cathlon IV™ i.v. catheter placement unit* 16 G, 57 mm (Critikon)
- mitja de niló

SOLUCIONS

Tampó d'incubació KRHBA (pH 7,4):

Na Cl	120 mM
$MgSO_4$	1,2 mM
$CaCl_2$	1 mM
KCl	6 mM
Na H_2 PO_4	1 mM
Na_2 HPO_4	1 mM
Hepes	12,5 mM
Piruvat sòdic	2 mM
BSA (Sigma A-4503)	2%

Aquest tampó es prepara a partir de solucions mare de sals (apèndix I) i es gaseja amb carbogen (O_2:CO_2, 95:5) durant 5 min. El mateix dia de l'experiment s'afegeix l'albúmina bovina (BSA) i el piruvat sòdic havent separat prèviament un volum d'aquest tampó (tampó incomplet, KRHB) que serà utilitzat per diluir les drogues i com a tampó de rentat.

Solució de digestió: Col·lagenasa 0,66 mg/ml en tampó d'incubació (col·lagenasa tipus I, CLS1, Worthington)

PROCEDIMENT

1. El animals se sacrifiquen mitjançant dislocació cervical i se n'extreu el teixit adipós blanc epididimal i perirenal. A mesura que es va treient el teixit, aquest es posa en una placa de Petri amb una mica de tampó de rentat a 37ºC. Acabada l'extracció, el teixit es neteja una mica per eliminar-ne al màxim els capil·lars i altres impureses.
2. Es posa el teixit en un Falcon de 50 ml on s'hi ha posat prèviament 15 ml de solució de col·lagenasa (es pot posar el teixit de dues rates en el mateix Falcon augmentant el volum a 30 ml), es trosseja el teixit amb unes tisores i es deixa digerir amb la col·lagenasa a 37ºC amb agitació suau (50-75 rpm) durant aproximadament 30 minuts.

És important anar controlant la digestió per evitar el trencament dels adipòcits.

3. Acabada la digestió, es filtren les cèl·lules amb una mitja de niló i es renten 3 cops amb tampó de rentat. Els rentats consisteixen a afegir 15 ml de tampó incomplet en el Falcon on hi ha els adipòcits, agitar molt suaument per inversió, i deixar reposar el Falcon a 37ºC fins a observar que els adipòcits surin. Després, mitjançant una xeringa de 20 ml i un catèter, s'extreu al màxim el volum que queda sota el adipòcits i s'hi afegeixen 15 ml més de tampó de rentat. Quan ja s'han fet els 3 rentats es considera que s'ha rentat tota la col·lagenasa i albúmina del medi i es resuspenen els adipòcits en el volum i tampó desitjats (el volum i tampó on es resuspenen els adipòcits depèn de l'experiment que s'ha de dur a terme a continuació)

2.1.2. INCUBACIÓ *IN VITRO* D'ADIPÒCITS AÏLLATS

La incubació *in vitro* dels adipòcits aïllats s'ha utilitzat per estudiar l'efecte de determinats agents sobre un paràmetre concret de les cèl·lules adiposes; experiments de transport de 2-desoxiglucosa, tècniques d'immunofluorescència i d'immunoprecipitació i estat de fosforilació (activitat tirosina-fosfatasa PTP, activitat PKB, perfil de fosforilació en tirosines).

SOLUCIONS

Tampó d'incubació KRHBA (pH 7,4)
Tampó incomplet KRHB
Solucions estoc de drogues
KCN 0,2 M

PROCEDIMENT

1. Es resuspèn 1 volum d'adipòcits aïllats en 10 volums de tampó d'incubació i es reparteix homogèniament aquesta barreja en els vials on prèviament s'han afegit les drogues amb les quals es volen incubar els adipòcits. Les drogues s'afegeixen sempre 100 vegades concentrades de manera que la concentració final d'incubació sigui la desitjada.
2. Es deixen incubar els adipòcits durant 30-45 min a 37ºC amb agitació suau (30 minuts en el cas d'estat de fosforilació, 45 per al transport de glucosa).

3. Una vegada passat el temps d'incubació procedim de manera diferent segons el destí final dels adipòcits.

    3.1. Els experiments de transport es realitzen directament en els vials d'incubació dels adipòcits.
    3.2. En els experiments d'immunofluorescència s'atura la incubació afegint-hi KCN 0,2 M de manera que la concentració final de KCN en el vial d'incubació sigui de 2 mM, es deixa que aquest actuï durant 5 min a 37ºC amb agitació suau, i es fan tres rentats amb tampó incomplet.
    3.3. En els experiments d'estat de fosforilació es bescanvia el tampó d'incubació pel tampó d'homogeneïtzació corresponent.

Nota: en el cas dels experiments de transport els vials utilitzats per a la incubació han estat tubs de plàstic sense tap de 4 ml, amb els quals es treballa amb un volum final de solució d'adipòcits de 400 μl. En el cas dels experiments d'immunocitoquímica i d'estat de fosforilació s'han usat Falcons de 15 ml, i es treballa amb un volum final de 5-8 ml.

2.1.3. MESURA DEL TRANSPORT DE GLUCOSA

La glucosa no pot ser utilitzada per mesurar-ne el transport perquè es metabolitza i es transforma ràpidament en altres productes metabòlics. Per aquesta raó s'utilitzen anàlegs no metabolitzables per mesurar el transport de glucosa. Els més utilitzats són la 2-desoxi-D-glucosa (2DG) i la 3-O-metil-D-glucosa (3metG). La diferència principal que existeix entre tots dos anàlegs és que la 3metG no es fosforila un cop entra a la cèl·lula i arriba molt ràpidament a l'equilibri, de manera que per treballar en condicions de linealitat s'ha de mesurar del transport de 3metG en pocs segons (Whitesell and Gliemann, 1979). En el cas de la 2DG, una vegada entra a la cèl·lula pot ser fosforilada per l'hexoquinasa i s'acumula com a 2-desoxiglucosa fosforilada. La mesura del transport és pot fer en 5 o 10 minuts (Foley and Huecksteadt, 1984), la qual cosa resulta molt útil tenint en compte que la taxa de transport de 2DG és més feble que la de 3metG.

En aquesta tesi el transport de glucosa es determina per la mesura de captació de 2-desoxi-D-[3H]glucosa segons la tècnica original d'Olefsky (Olefsky and Kobayashi, 1978). Com que l'objectiu de la tècnica és la mesura de la 2DG transportada a l'interior de les cèl·lules, la darrera etapa d'aquest protocol consisteix a separar les cèl·lules del tampó amb el qual han estat incubades.

MATERIALS

- 2-desoxi-D[3H]glucosa (ARC): activitat especifica de 26,2 Ci/mmol.
  concentració de 1 mCi/ml.
- Tubs d'incubació de 4 ml sense tap (Elkay, núm. 000-2053-IRI)
- Microtubs de polietilè per separar de les cèl·lules i el tampó (Elkay, núm. 000-MICR-041)
- Líquid d'escintil·lació (ICN, Ecolite, núm. 882475)

SOLUCIONS

Solució radioactiva

100µl de solució radioactiva afegits a cada vial corresponen a:

89,2 µl de tampó d'incubació

10 µl de 2DG 5mM

0,8 µl de 2-desoxi-D[3H]glucosa

En el moment del transport, la solució radioactiva es dilueix i queda una concentració final de 0,1 mM de 2DG (50 nmols per tub d'incubació).

Citocalasina B: 10 mM en etanol (Sigma)

Di-isononil ftalat [bis(3,5,5-trimetilhexil)ftalat]: solució oliosa amb una densitat de 980 g/l (Fluka)

PROCEDIMENT

1. Els adipòcits aïllats, diluïts 1/10 amb tampó d'incubació KRHBA i les drogues corresponents s'incuben en tubs de plàstic sense tap de 4 ml en un volum final de 400 µl durant 45 minuts.
2. Una vegada acabada la incubació a 37ºC, sota agitació constant, s'afegeixen 100 µl de solució de 2-desoxi-D[3H]glucosa (0,8 µCi) a una concentració final de 0,1 mM.
3. La incubació en presència de 2DG dura 5 minuts i s'atura amb l'addició de 100µl de citocalasina B (100 µM final).
4. Immediatament després d'haver aturat el transport, cada tub s'agita manualment per resuspendre els adipòcits i 200 µl es transfereixen a microtubs que contenen 150 µl de di-isononilftalat. Aquests microtubs es centrifuguen a 13.000 rpm durant 2 minuts en una microcentrifugadora de sobretaula. Un cop acabada la centrifugació s'observen les cèl·lules adiposes compactades a la part superior dels microtubs, la solució oliosa al mig i el tampó d'incubació radioactiu a la part inferior.
5. Els tubs es tallen al nivell de la fase oliosa, no pas de la radioactiva perquè la 2DG

lliure és hidròfila, i la part superior dels microtubs es posa en vials d'escintil·lació. S'afegeix 5 ml de líquid d'escintil·lació i després d'agitar els vials amb el vòrtex es compten en un comptador de partícules β.

6. Per avaluar la quantitat de radioactivitat total present a cada tub d'incubació es posen 100 μl de solució radioactiva en dos vials d'escintil·lació. Les dpm obtingudes en aquestes condicions (activitat total, AT) corresponen a 50 nmols de 2DG.

CÀLCULS

Per a convertir les dades de dpm en nmols 2DG / 100 mg de lípids / 5 minuts fem el càlcul següent:

$$\frac{\text{dpm vial x 600 μl (volum total) x 50 nmols 2DG (l'afegida) x 100 (per tenir-ho en 100 mg lípids)}}{\text{dpm activitat total x 200 μl (volum comptat) x mg lípid del Dole}}$$

Com que el transport ha estat realitzat en 5 minuts el resultat obtingut ja és en 5 minuts.

2.1.4. QUANTIFICACIÓ DE LÍPIDS

Aquesta quantificació es realitza segons la tècnica de DOLE i s'utilitza per ponderar els resultats de transport de 2DG per 100 mg de lípids.

SOLUCIONS

Solució DOLE

1 volum d'heptà
4 volums d'alcohol isopropílic
0,1 volums de H_2SO_4 1N

PROCEDIMENT

1. En fer la repartició de cèl·lules en tubs d'incubació per fer el transport de glucosa, es guarden per duplicat 400 μl de la mateixa solució de cèl·lules (1/10). La mesura de lípids d'aquestes dues mostres permet conèixer la quantitat de lípids continguts a cada vial d'incubació.
2. S'afegeixen, a cada tub, 2 ml de solució DOLE, s'agiten els tubs amb el vòrtex i es deixen reposar durant 2-5 minuts. Tot seguit s'afegeixen 2 ml d'heptà, s'agiten amb el vòrtex i es deixen reposar els tubs durant 5 minuts. S'hi observa la formació de dues fases: una fase superior orgànica que conté els lípids cel·lulars, i una fase inferior

aquosa amb les proteïnes precipitades.

3. La fracció orgànica representa 2,4 ml d'heptà. Se n'agafen 2 ml i es posen en un vial de vidre prèviament tarat a la balança de precisió.
4. Els vials de vidre amb els lípids dissolts a l'heptà es deixen sota una campana a fi que l'heptà s'evapori durant 48 h. La diferència entre el pes final i l'inicial del vial de vidre (P) correspon al pes dels lípids continguts en 2 ml d'heptà. Per obtenir el pes dels lípids corresponents a cada tub d'incubació cal multiplicar P pel factor de correcció 2,4/2.

Nota: l'heptà permet que es dissolguin els lípids, l'alcohol isopropílic fa precipitar les proteïnes i el H_2SO_4 acidifica el medi i permet l'extracció dels àcids grassos.

2.1.5. OBTENCIÓ D'HOMOGENATS I MEMBRANES TOTALS A PARTIR D'ADIPÒCITS AÏLLATS

SOLUCIONS

HES (pH 7,4) (apèndix I)
Tampó homogeneïtzació: HES (pH 7,4) + inhibidors de proteases (apèndix I)
Hepes 30 mM (pH 7,4)

PROCEDIMENT

1. Una vegada ha acabat la digestió dels adipòcits es fan 3 rentats amb tampó incomplet, després de l'últim rentat, per a un volum de cèl·lules de 2-4 ml provinents d'una rata, s'afegeixen 10 ml de tampó d'homogeneïtzació per preparar membranes totals; si es volen preparar homogenats totals s'afegeix un volum igual de tampó al de cèl·lules.
2. S'homogeneïtzen les cèl·lules amb un homogeneïtzador de vidre amb l'èmbol de tefló 7 vegades a velocitat 6, en gel. Alternativament, si el volum a homogeneïtzar és petit, es pot homogeneïtzar fent passar la suspensió de cèl·lules per una agulla de 25 G 10 cops.
3. Es recull l'homogenat en tubs nalgene de 30 ml i se centrifuga a 5.000 x g (5.900 rpm en un rotor Sorvall SA-600) durant 10 minuts a 4ºC.
4. Es descarta el greix sòlid de la part superior del tub i el precipitat de material no homogeneïtzat i nuclis. El sobrenedant constitueix l'**homogenat total adipòcits aïllats**.
5. Per preparar membranes totals, es transfereix el sobrenedant a un tub d'ultracentrífuga de 10 ml i se centrifuga a 200.000 x g (48.000 rpm, rotor T-875, SORVALL) durant 75 minuts a 4ºC. El precipitat obtingut, les **membranes totals d'adipòcits aïllats,** es resuspèn en uns 200 μl d'Hepes 30 mM amb l'ajuda d'una xeringa i una agulla de 25G.
6. Es valora la quantitat de proteïna recuperada pel mètode de Bradfort.
7. Es fraccionen les resuspensions de cada mostra en parts alíquotes, es congelen amb nitrogen líquid i es conserven a –80ºC.

2.1.6. OBTENCIÓ DE LÀMINES DE MEMBRANA PLASMÀTICA

L'obtenció de llençols de membrana plasmàtica, *plasma membrane lawns*, d'adipòcits aïllats de rata és una adaptació del mètode descrit per Heuser (Heuser and Anderson, 1989).

SOLUCIONS

Parafolmaldehid	3%
KCl	0,1 M
Poli-L-lisina (P-1523)	5 mg/ml (en KCl 0,1M)
KCN	0,2 M
KHMgE (pH 7,5):	
KCl	70 mM
Hepes	30 mM
$MgCl_2$	5 mM
EGTA	3 mM

PROCEDIMENT

Preparació dels cobreobjectes:

1. Es renten els cobreobjectes amb etanol al 95%.
2. Aquests es flamegen i es posen en una solució de 5 mg/ml de poli-L-lisina en KCl 0,1 M durant 15-30 minuts.
3. Es renten els cobreobjectes 4 vegades amb KCl 0,1M

Obtenció de les làmines:

1. Després de fer l'aïllament dels adipòcits i, donat el cas, la incubació amb els agents corresponents, aquests es tracten 5 minuts amb KCN 2 mM.
2. Seguidament es renten una vegada amb tampó incomplet a temperatura ambient; aquest rentat serveix per eliminar-ne l'albúmina i evitar que aquesta s'enganxi al cobreobjectes tractat amb poli-L-lisina.
3. Amb una pipeta Pasteur de plàstic es diposita una gota de suspensió de cèl·lules en un tros de parafilm i esperem que el màxim nombre de cèl·lules estiguin a la superfície de la gota.
4. Suaument, es toquen les gotes de cèl·lules amb el cobreobjectes, prèviament tractat amb poli-L-lisina (les cèl·lules s'haurien d'enganxar al moment, si es veu que no s'han enganxat gaire cèl·lules es pot repetir l'operació).

5. Es posen els cobreobjectes de manera que les cèl·lules quedin a la cara superior i es renten amb KHMgE (diluït 1/3 en aigua bidestil·lada). Per fer els rentats es posen els cobreobjectes en una placa de 24 pous i s'afegeix a cada pou uns 2 ml de tampó amb una pipeta, la placa es buida tot girant-la.
6. S'incuben les cèl·lules durant 5 minuts amb KNMgE (diluït 1/3).
7. Les plaques es mantenen refredades en gel i s'omplen els pous amb KHMgE. Amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur de plàstic i aspirant i estirant amb força el tampó del pou, es trenquen les cèl·lules, de manera que tan sols resta enganxada la membrana en contacte amb el cobreobjectes.
8. Una vegada acabat el procés de ruptura es fan 2 rentats com els esmentats abans amb KHMgE i es procedeix a fixar les cèl·lules amb PFA 3% durant 30 minuts.

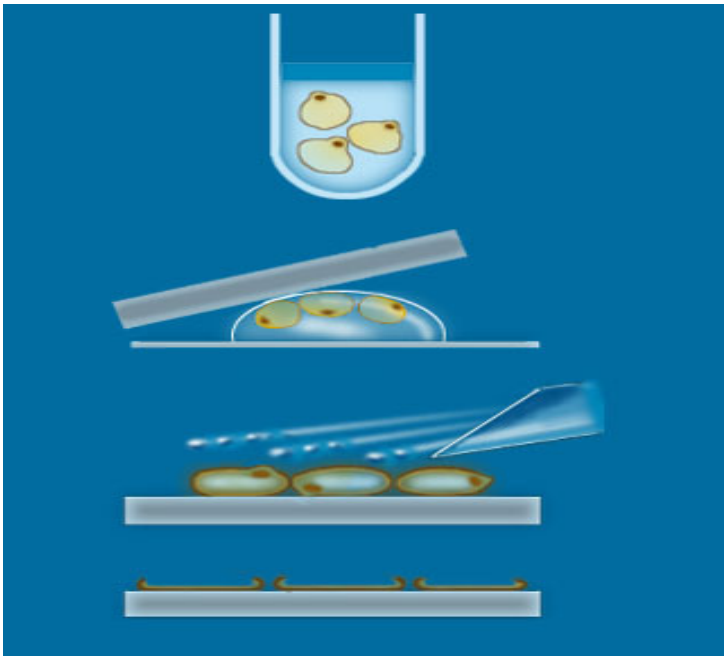


Figura 3. protocol per a l'obtenció de les làmines de membrana plasmàtica (*plasma membrane lawns*).

A partir d'aquests moments **les làmines de membrana plasmàtica, *plasma membane lawns*,** ja estan preparades per iniciar el protocol de immunolocalització; si aquest no es realitza de seguida, es guarden les làmines de membrana plasmàtica amb PBS que conté azida (NaN_3) al 0,02%.

Nota: en aquest tipus d'experiment la quantitat d'adipòcits no és limitant perquè a l'hora d'enganxar els adipòcits en cobreobjectes s'utilitzen molt poques cèl·lules. Per aquesta raó per fer altres experiments moltes vegades és suficient utilitzar les cèl·lules sobrants incubades. En cas que s'incubin les cèl·lules només per fer làmines de membrana plasmàtica, partim d'1 ml de cèl·lules compactes, pensant en que hi pot haver pèrdues durant els rentats.

2.2. MÚSCUL

Com a múscul esquelètic vermell s'ha utilitzat el múscul *soleus*. Com a múscul esquelètic blanc s'ha utilitzat el múscul EDL (extensor digitorum longus). També s'ha usat el *tibialis* que és una barreja de músculs blanc i vermell.

2.2.1. AÏLLAMENT

MATERIALS

- Material de cirurgia (tisores, pinces, pinces de posició fixa, bisturí, agulla corba, fil de seda trenada, etc.)
- Suport de peu plat i pinça de pales mòbils per aguantar la cama
- Plaques de Petri

Extracció del *soleus* i obtenció de *strips*:

1. S'aguanta el peu de la rata pels dits amb una pinça unida a un suport, de manera que la cama queda formant un angle de 90º amb la taula on està estirat l'animal.
2. Es talla la pell pel turmell i es desplaça fins a l'alçada del genoll, deixant a la vista la musculatura.
3. S'agafa el tendó distal del múscul *plantaris* amb unes pinces de posició fixa, es talla i se separa tota la massa muscular unida de la resta de la musculatura de la zona, tot estirant en direcció a la part posterior del genoll i fins a arribar a la seva alçada.
4. A la part interior del paquet muscular que es manté pinçat queda al descobert el múscul *soleus*. Se separa el múscul de la resta del paquet muscular al qual es troba unit amb l'ajuda d'una fulla de bisturí, tallant els vasos i els nervis que li arriben per la part posterior.
5. Amb una agulla corba es fa una incisió en el tendó proximal i se separa 1/3 del múscul separant les fibres musculars i fent pressió amb l'agulla en sentit vertical i descendent. Es fa passar un fil per sota el tendó proximal i es lliga al ferret que mantindrà tensat l'*strip* de *soleus*.
6. En arribar a l'alçada del tendó distal del *soleus*, aquest es lliga a l'altre extrem del ferret i es talla el tendó, quedant l'*strip* aïllat i tens.
7. Es col·loca l'*strip* a un medi tamponat a pH 7,4 i refredat amb gel fins al moment de la incubació.
8. Es repeteix el procés d'aïllament i tensió del següent *strip*, agafant un altre terç de múscul, fins a tenir tots tres *strip*s.

Nota: en el cas que el múscul no s'usi per a transport sinó per a preparar-ne extractes totals, RNA o membranes, no cal fer els *strip*s ni mantenir-los en tensió; atès que el múscul s'aïlla sencer i o bé es processa o es congela ràpidament en nitrogen líquid i es guarda a -80ºC. En

el cas del transport de múscul *ex vivo* amb rates petites, s'aïlla del múscul sencer sense necessitat de mantenir-ne la tensió i un cop extret es divideix en dos, el transport procedeix igual que en el cas dels *strip*s. És important que els músculs o *strip*s que s'han d'usar pe r al transport no s'assequin, per això, es poden anar mullant amb salí durant l'extracció.

Extracció del *tibialis* anterior i de l'EDL:

1. Es talla i es desplaça la pell des del turmell fins a l'alçada del genoll, mantenint el peu de la rata estès.
2. Per la part anterior i en posició distal s'observen dos tendons paral·lels corresponents als músculs *tibialis* anterior i EDL. Per sobre d'aquests tendons i en posició obliqua se situa el lligament anul·lar. S'aïlla amb l'ajuda d'unes pinces i es talla aquest lligament.
3. S'agafa el tendó més superficial, que és el que correspon al *tibialis* anterior, es talla i s'estira el múscul en direcció al genoll, tallant-lo en arribar-hi.
4. L'EDL que encara queda lligat a la resta del paquet muscular s'aïlla tot tallant els seus tendons distal i proximal.
5. Els músculs es processen o es congelen ràpidament en nitrogen líquid i es guarden a -80ºC fins al moment del seu processat.

2.2.2. ASSAIG DEL TRANSPORT DE GLUCOSA

MATERIALS

- Erlenmeyers de vidre de 50 ml
- Peces de filferro d'alumini per tensar els *strip*s de *soleus*

SOLUCIONS

D-[^{3}H]manitol (NEN)
2-deoxy-D-[^{14}C]glucosa (NEN)
Albumina (Sigma A-6003) 10% en KRHB, dialitzada, filtrada i guardada a -20ºC
Salí: NaCl 0,9%
Pentobarbital sòdic 70mg/kg pes corporal
Insulina 100 nM diluïda en KRHB
Biosol (Dupont)

Tampó KRHB (*Krebs- Ringer Hepes Buffer*) (apèndix I)

KRHB + glucosa:

97 ml de KRHB
+ 1 ml de glucosa 0,5 M (5 mM final)
+ 2 ml d'albúmina 10% (0,2% final)

KRHB + piruvat:

97 ml de KRHB
+ 1 ml de piruvat 0,2 M (2 mM final)
+ 2 ml d'albúmina 10% (0,2% final)

Solució radioactiva de transport:

3,925 ml KRHB + piruvat
+ 500 μl de manitol 100 mM (1 mM final)
+ 25 μl de ^{3}H-manitol (0,5 μCi/ml final)
+ 500 μl de glucosa 10 mM (0,1 mM final)
+ 50 μl de ^{14}C-2-deoxiglucosa (0,1 μCi/ml final)

Nota: el manitol no pot entrar a dins les cèl·lules, així, el triti (^{3}H) representa el medi extracel·lular. La glucosa es troba tant dins com fora de les cèl·lules. La radioactivitat extracel·lular es calcula mitjançant la diferència entre el ^{14}C i el ^{3}H.

PROCEDIMENT

1. S'anestesien els animals, rates *Wistar* d'uns 250 g amb pentobarbital sòdic.
2. S'extreuen els *strip*s de *soleus* i es mantenen a 4ºC aproximadament amb 20 ml de KRHB + glucosa fins acabada l'extracció de l'última rata. A cada vial es col·loquen 2 o 3 *strip*s d'un mateix múscul. A partir d'ara tot el procés d'incubació i transport es realitza

en un bany amb agitació suau, a 37ºC en vials gasejats amb carbogen.

3. S'incuben els *strip*s durant 10 minuts amb 4 ml de KRHB + glucosa perquè aquests es temperin.
4. S'hi afegeixen les drogues, 100 cops concentrades, i s'incuba durant 45 minuts.
5. Es traslladen els *strip*s a uns nous vials que contenen 4 ml de KRHB + piruvat i les drogues i s'incuben durant 10 minuts. Aquesta incubació serveix per eliminar-ne la glucosa.
6. Es traslladen els *strip*s a uns nous vials que contenen 3,6 ml de KRHB + piruvat, 400 μl de la solució radioactiva i les drogues i es deixa que es produeixi el transport de glucosa durant 20 minuts.
7. Es treuen els *strip*s de la solució radioactiva de transport, es netegen submergint-LO en salí i s'assequen lleugerament amb paper absorbent.
8. S'allibera l'*strip* de la peça de metall que el manté tens i es congela en nitrogen líquid.
9. Es pesen els *strip*s congelats i es dipositen a vials d'escintil·lació de plàstic que contenen 800 μl de Biosol per a la seva digestió.
10. La digestió es realitza incubant els vials durant 1 hora a 50ºC en un bany amb agitació forta.
11. Uba vegada acabada la digestió s'afegeixen 5 ml de líquid d'escintil·lació i es porten a comptar amb un programa que mesura comptes de ^{14}C i ^{3}H.
12. Per determinar de la radioactivitat total es compten per duplicat 50 μl de la solució de transport.

CÀLCULS

A fi de convertir les dpm en una mesura de la captació de glucosa cal fer els càlculs següents:

$$\textbf{nmols glucosa/g múscul} = \frac{\textbf{(dpm}\,^{14}\textbf{C múscul/g múscul)-((dpm}\,^{14}\textbf{C medi/ml medi) x (EE/g múscul))}}{\textbf{(dpm}\,^{14}\textbf{C medi/}\mu\textbf{mol glucosa medi)}}$$

$$\textbf{EE (espai extracel·lular)} = \frac{\textbf{dpm}\,^{3}\textbf{H múscul/g múscul}}{\textbf{dpm}\,^{3}\textbf{H medi/ml medi}}$$

El resultat final s'expressa per minut; com que el transport s'ha realitzat en 20 minuts cal dividir el valor obtingut per 20.

L'espai extracel·lular normalment presenta valors al voltant de 0,3. Valors allunyats de 0,3 poden indicar una accessibilitat anormal de la glucosa a l'interior de la fibra muscular.

2.2.3. TRANSPORT DE MÚSCUL *EX VIVO*

El múscul, el qual no expressa SSAO, és el teixit que capta la major part de glucosa de l'organisme i per tant, podria contribuir a la millora de la tolerància a la glucosa observada després de l'administració de benzilamina i vanadat de manera aguda. Per aquest motiu es va voler estudiar com es trobava el transport de glucosa al múscul després d'una injecció aguda de benzilamina i vanadat.

Per a la realització d'aquest experiment s'utilitzen rates *Wistar* petites, d'uns 90 g, de manera que els músculs *soleus* que se n'obtenen es poden utilitzar dividits per la meitat per al transport de glucosa, sense la necessitat de fer *strip*s ni mantenir-LO en tensió. Els animals s'han dejunat tota la nit.

MATERIALS

- Insulina porcina purificada (Eli Lilly, Indianapolis, USA) 5 mg/ml en HCl 10 mM.

PROCEDIMENT

1. S'anestesien els animals amb pentobarbital sòdic (50 mg/kg pes corporal).
2. S'injecta el fàrmac corresponent a rates a través de la vena de la cua: PBS, 10 U/kg d'insulina, 20 μmol/kg de vanadat, 7 μmol/kg de benzilamina o la combinació de tots dos.
3. 25 minuts després de l'administració del fàrmac es procedeix a l'extracció del múscul *soleus*. Un cop extret, aquest es renta amb salí i es divideix en duess parts iguals amb un bisturí.
4. Es dipositen tots dos fragments de múscul en una solució de KRHB + piruvat conservada a 4ºC per a netejar-LO de restes de sang.
5. Es traslladen els músculs a un nou vial on es troba la solució radioactiva i es realitza el transport de glucosa durant 20 min a 37ºC (vegeu el punt 2.2.2.).

2.3. PÀNCREES

Per obtenir suficients illots pancreàtics s'han utilitzat rates de 300 g. Per tal de comprovar que els illots obtinguts són realment illots i no exocrí existeix un producte que els tenyeix específicament ja que s'uneix a les molècules de zinc de la insulina. Un cop tenyits els illots ja no es poden utilitzar, però serveix per comprovar una part alíquota. Aquest producte és la difeniltiocarbazona o ditizona (DTZ, Sigma núm. D-5130).

MATERIALS

- Pots d'orina
- Catèter de polietilè PE-50
- Estereomicroscopi
- Tubs incubació d'illots (tipus Technicon 1,5 ml, DeltaLab núm.PLA900022)
- Histopaque-1077 (Sigma núm.1077-1)
- Histopaque-1119 (Sigma núm.1119-1)
- Albúmina bovina (BSA), fracció V (Gibco BRL núm.11018-025)
- Solució de Hank's (HBSS, Hank's Balanced Salt Solution, Biowittaker núm.BE10-527F)
- D-glucosa (Merck núm.8342)
- Col·lagenasa P (Roche Diagnostics núm.1213 865)

2.3.1. OBTENCIÓ D'ILLOTS PANCREÀTICS

Hem obtingut illots pancreàtics per fer dos tipus d'estudis: a) secreció d'insulina en presència de benzilamina i vanadat i b) determinació de l'existència d'SSAO en illot pancreàtic.

SOLUCIONS

Hank's + BSA 0,1%
Hank's + col·lagenasa 1 mg/ml
Solució de DTZ: 5 mg de DTZ en solució de Hanks que conté un 10% de dimetilsulfoxi (DMSO).

PROCEDIMENT

L'obtenció d'illots pancreàtics consta de diversos passos:

Aïllament del pàncrees:

1. Es mata l'animal per dislocació cervical i s'obre la cavitat abdominal a l'alçada del fetge. Es desplaça cap amunt el fetge de l'animal pressionant per la part superior.
2. Es localitza el conducte colèdoc i es pinça amb unes pinces de posició fixa a la seva part distal, l'extrem que arriba al duodè, per a tancar el pas cap a l'intestí.
3. Es realitza un petit tall a l'altre extrem del colèdoc, per la seva part més proximal prop del fetge, i es canula amb un catèter de polietilè PE-50 al qual s'ha unit una xeringa que conté 10 ml de la solució Hank's amb col·lagenasa. S'injecta el volum de la xeringa dos cops (un total de 20 ml). Cal aguantar la cànula amb una pinça perquè en fer la pressió per a introduir la solució al pàncrees la cànula no surti de l'interior del colèdoc. A mesura que es va injectant la solució s'omple el sistema ductular pancreàtic de manera retrògrada la qula cosa origina una disrupció mecànica de la glàndula exocrina. És important que la part més terminal d'aquest quedi plena ja que conté gran abundància d'illots endocrins.

4. Un cop el pàncrees inflat s'aïlla començant per l'intestí prim, després el gruixut, la melsa i l'estómac i acabant pel fetge.
5. Es col·loca el pàncrees en una placa de Petri que conté solució de Hank's i es neteja de nòduls limfàtics, teixit adipós i vasos sanguinis.
6. Es col·loca el pàncrees en un pot d'orina que conté 30 ml de solució de Hank´s amb col·lagenasa refredada en gel, a cada pot es poden col·locar dos pàncrees.

Digestió i rentats:

1. Es digereix el pàncrees durant 20 minuts a 37ºC en agitació lenta.
2. Un cop acabada la digestió s'hi afegeix tampó Hank's amb albúmina refredat en gel fins a dalt del pot i es deixa decantar el pàncrees digerit posant el pot en gel durant 5 minuts.
3. Es treu el sobrenedant i es renta amb tampó Hank's-BSA dos cops més.
4. En l'últim rentat es deixen uns 15 ml de tampó i es filtra tot el conjunt amb una malla de 300 μm de manera que es recull el filtrat en un Falcon.
5. S'omple el Falcon amb tampó Hank's-BSA i es centrifuga durant 5 minuts a 500 x g (2.000 rpm a la centrífuga Centronic) i a 4ºC. El sobrenedant s'elimina per decantació.

Tot el procés després de la digestió s'ha de fer a 4ºC o mantenint els Falcons en gel.

Purificació dels illots per gradient de densitat:

1. Es resuspèn el precipitat amb 20 ml de Histopaque-1119 homogeneïtzant-lo molt amb una pipeta Pasteur de plàstic. Es reparteix l'homogenat en dos Falcons.
2. S'hi afegeixen amb cura 10 ml de Histopaque-1077 a sobre sense que es trenqui la interfase.
3. S'hi afegeixen a sobre 10 ml de la solució Hank's-BSA .
4. Se centrifuga durant 20 minuts a 1.000 x g (3.000 rpm a la centrífuga Centronic) i a 10ºC.
5. Es recupera la interfase entre la solució de Hank's-BSA i el Histopaque-1077 que conté els illots en suspensió (figura 5), sovint també cal recollir la fase de Histopaque-1077.
6. Es tornen a ajuntar el illots de tots dos Falcons i s'hi afegeix solució de Hank's-BSA fins a dalt.
7. Se centrifuga 5 minuts a 500 x g i a 4ºC.
8. Se'n descarta el sobrenedant i es repeteixen els rentats dos cops més.
9. Es resuspèn el precipitat en uns 10 ml de solució de Hank's-BSA.

Pesca dels illots:

1. Es col·loquen els illots en una placa de Petri i es pesquen sota estereomicroscopi amb una nansa de vidre (doblegant l'extrem d'una pipeta Pasteur de vidre) per evitar agafar

pàncrees exocrí.

2. Es mantenen en gel fins que es completa tota la pesca.

Tinció dels illots amb ditizona:

1. Es renten els illots afegint-hi solució de Hanks diverses vegades per a eliminar-ne l'albúmina que dificulta la tinció per la DTZ.
2. S'afegeix la solució de DTZ a una part alíquota de la suspensió d'illots, aquests queden tenyits de vermell, aquests illots ja no es poden utilitzar per a experiments de secreció o obtenció d'extractes.

En cas d'observar que s'ha pescat massa exocrí cal repescar la suspensió d'illots.

2.3.2. SECRECIÓ D'INSULINA

La secreció d'insulina es realitza en dues condicions diferents. Es determina la secreció en un tampó que conté glucosa 5,5 mM, aquesta ens dóna la secreció basal. També s'incuba els illots en un tampó que conté glucosa 16,7 mM, que és una concentració que estimula la secreció d'insulina.

Sempre realitzem en paral·lel la secreció d'insulina de rates Goto-Kakizaki (GK) i *Wistar*. En general s'obtenen uns 250 illots per cada pàncrees de les rates *Wistar* i 100 illots per cada pàncrees de les rates GK.

La quantitat d'insulina secretada en el medi d'incubació per a cada condició s'expressa com a μU / illot / 90 minuts d'incubació.

SOLUCIONS

Tampó d'incubació, a pH 7,4:

NaCl	460 mM
CO_3HNa	96 mM
KCl	20 mM
$MgCl_2$	4 mM
$CaCl_2$	4 mM
BSA	5 mg/ml

PROCEDIMENT

1. S'omplen els vials d'incubació amb 1 ml de tampó d'incubació amb glucosa 5,5 o 16,7 mM i es mantenen en gel.
2. Durant la pesca es van col·locant 6 illots per vial d'incubació, mantenint-LO en gel fins que es completa tota la pesca.
3. S'afegeixen les drogues a testar als vial d'incubació; és important que el pH del medi quedi entre 7,2 i 7,4. Per a cada droga que s'ha de testar calen 6 tubs amb 6 illots cadascun.

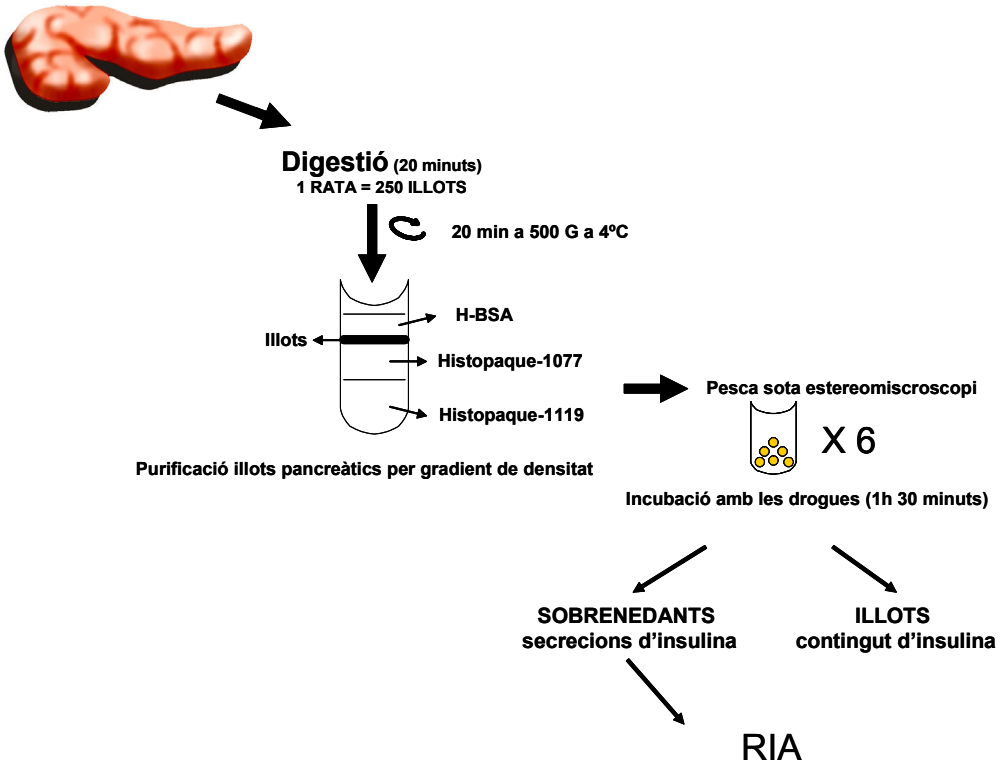


Figura 4. Protocol d'obtenció i incubació d'illots pancreàtics per als experiments de secreció d'insulina.

4. Es col·loquen els vials d'incubació dins de vials de vidre i es tapen amb taps de goma foradats i connectats a un sistema de carbogen (O_2/CO_2; 95/5%; v/v).
5. Es col·loquen els vials en un bany a 37ºC amb agitació suau i es gasegen durant 10 minuts. Es deixa la incubació durant 1 hora i 20 minuts més, sense gasejar.
6. Un cop acabada la incubació es col·loquen els vials en gel i s'agafen 900 μl del tampó d'incubació, on s'haurà secretat la insulina, i es guarden a un tub Eppendorf a -20ºC fins a determinar-ne la insulina.
7. S'afegeixen 500 μl de solució àcid alcohol (75% etanol, 37% HCl en aigua) als illots i se soniquen 15 vegades (Sonifier 250 Branson, Duty Cycle 30-40), es deixen precipitar a 4ºC tota la nit i se centrifuguen durant 15 minuts a 4ºC i a 3.500 rpm. Els illots es guarden a -20ºC per a determinar el contingut en insulina si es desitja, en el nostre cas no el vam determinar.

2.3.3. EXTRACTES D'ILLOTS PANCREÀTICS

SOLUCIONS

Solució de lisi de triple detergent (TDLB: *triple detergent lysis buffer*) a pH 8:

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
SDS	0,1%
Azida	0,02%
Igepal NP-40	1%
Deoxicolat sòdic	0,5%

Figura 4: Protocol obtenció i incubació d'illots pancreàtics per als experiments de secreció d'insulina.

Cal afegir un còctel d'inhibidors en fred: pepstatina A 2 μM, PMSF 2 mM, leupeptina 1 μM, aprotinina 1 μg/μl, benzamidina 20 mM.

PROCEDIMENT

1. S'afegeixen 50 μl de la solució TDLB amb inhibidors de proteases per 50 illots.
2. S'homogeneïtza amb l'ajuda d'una pipeta automàtica.
3. Es quantifica la proteïna pel mètode de Pierce i es guarden alíquotes a -80ºC fins a l'anàlisi per transferència *Western blot*.

2.4. OBTENCIÓ D'HOMOGENATS I DE MEMBRANES TOTALS A PARTIR DE TEIXIT

El protocol per lobtenir les preparacions de membranes totals a partir de diferents teixits de rata es basa en l'homogeneïtzació del teixit en un tampó refredat en gel que conté diferents inhibidors de proteases (aprotinina, benzamidina, PMSF, leupeptina i pepstatina A), en una centrifugació a baixa velocitat, que permet descartar les restes de teixit mal homogeneïtzat, els nuclis i els mitocondris, i en una centrifugació a alta velocitat. Aquest és semblant al d'obtenció de membranes a partir adipòcits aïllats, però es diferencia en la manera inicial de processar el teixit.

Les membranes totals de teixit adipós de rata i ratolí és la font d'SSAO principal usada en els assaigs d'activitat enzimàtica per a la identificació de nous substrats.

SOLUCIONS

Tampó d'homogeneïtzació: HES (pH 7,4) + inhibidors de proteases (apèndix I)
Hepes 30 mM (pH 7.4)

PROCEDIMENT

1. S'homogeneïtzen 1-3 g de teixit en 8 ml de tampó en tubs de tipus *Corex* (30 ml). L'homogeneïtzació es fa amb el politró utilitzant una sonda d'1 cm de diàmetre i mantenint el tub amb el teixit en gel. Es fa servir l'aparell a 4-6 unitats de la seva escala de velocitat durant cicles de 30 segons fins a aconseguir una bona homogeneïtzació. Després de cada cicle cal desenganxar de les ganivetes les restes de teixit que hi queden atrapades.
2. Secentrifuguen els homogenats a baixa velocitat (rotor Sorvall SA-600). Les característiques de centrifugació són variables segons el teixit. En el cas dels teixits adiposos se centrifuga 5 minuts a 5.000 x g i, en el cas de múscul esquelètic, 10 minuts a 10.000 x g. Els sobrenedants d'aquesta centrifugació constitueixen els **homogenats totals del teixit**, en el cas del teixit adipós cal tenir cura de no agafar el greix sòlid de la part superior.
3. Per obtenir membranes totals de múscul esquelètic cal solubilitzar les miofibril·les en KCl 0,8 M. Per això, es recull el sobrenedant, es porta fins a 8 ml amb tampó d'homogeneïtzació i s'hi afegeixen 2 ml de KCl 4 M; tot seguit s'incuba en un agitador orbital durant 30 minuts a 4^{o}C
4. Es descarten els precipitats i es transfereixen els sobrenedants a tubs d'ultracentrifugadora i se centrifuguen a 200.000 x g (48.000 rpm, rotor Sorvall T-875) durant 1 hora 30 minuts a 4ºC
5. El precipitat obtingut, **membranes totals de teixit**, es resuspèn en Hepes 30 mM (volum variable entre 50 i 200 μl segons la mida del precipitat).
6. Es valora la quantitat de proteïna, se'n fan parts alíquotes i es conserven a -80ºC.

Nota: la resuspensió es fa mantenint els tubs en gel. Es comença resuspenent amb pipeta automàtica P200, tot seguit se substitueix la punta per una punta aixafada i, finalment, s'utilitza una agulla de 25 G.
Nota 2: per obtenir membranes de teixit adipós de ratolí el protocol de preparació és idèntic al de rata.

3. ESTUDIS AMB CÈL·LULES EN CULTIU

3.1. TÈCNIQUES GENERALS DE CULTIU CEL·LULAR

La manipulació de cèl·lules sempre s'ha fetsota condicions d'estricta esterilitat per evitar contaminacions (bacterianes, de llevats, etc.). Així, s'ha treballat sempre dins d'una campana de flux laminar vertical (ESI) tenint la precaució de netejar sempre les superfícies amb etanol, tant abans de començar com en acabar, i amb l'ajut d'un bec Bunsen (per flamejar el material). Sempre s'ha utilitzat material estèril, ja sigui de fàbrica (com tot el de plàstic, pipetes, tubs, ampolles i plaques de cultiu, etc.), ja sigui esterilitzant-lo mitjançant la utilització de l'autoclau. En el cas dels reactius, s'ha intentat, sempre que ha estat possible, que fossin de qualitat per a cultius cel·lulars (normalment ja estèrils), i s'han manipulat sota campana. En cas que no fossin estèrils, s'han autoclavat en ampolles de vidre (com és el cas de les solucions salines), o bé s'han filtrat mitjançant filtres de 0,22 μm de mida del porus (Schleicher & Schuell).

La línia cel·lular utilitzada en aquesta tesi ha estat la 3T3-L1 d'embrió de ratolí adquirida a ATCC. L1 és una sublínia de 3T3 (ratolí Swiss albí) desenvolupada mitjançant l'aïllament d'un clon per Green i col·laboradors (Green and Meuth, 1974). Aquestes cèl·lules es caracteritzen per la conversió que sofreixen de preadipòcits a adipòcits *like* quan passen de multiplicar-se ràpidament a un estat de confluència i d'inhibició per contacte. La presència d'un alt contingut de sèrum en el medi de cultiu permet un alt grau d'acumulació de greix d'aquestes cèl·lules.

Les condicions de cultiu de les cèl·lules 3T3-L1 són les que es descriuen a continuació.

Les cèl·lules 3T3-L1 han estat manipulades seguint les pautes estipulades per ATCC. Com a consideracions principals podem destacar que les cèl·lules s'han cultivat sempre en superfícies de plàstic i el medi de cultiu s'ha canviat 3 vegades a la setmana. Els fibroblasts es cultiven amb sèrum de vedell (Calf Serum, CS) al 10% i es mantenen en òptimes condicions de creixement fent subcultius abans que les cèl·lules arribin a confluència, s'ha de vigilar de no fer mai dilucions amb una concentració baixa de cèl·lules perquè poden aparèixer variants (subclonatge).

3.1.3. MEDIS DE CULTIU

REACTIUS

- DMEM: Gibco núm. 41966-029 amb 0,11 g/l piruvat sòdic, 2 mM glutamina i piridoxina. És un medi amb elevada glucosa (25 mM).
- Fetal Bovine Serum (FBS): Gibco 10270-106
- Calf Serum (CS): BioWhittaker 14-401 F
- Penicil·lina/estreptomicina: Gibco 15140-122
- Albúmina (BSA): Sigma A-6003

Medi de cultiu per a fibroblasts 3T3-L1 (CS 10%)

DMEM amb 25 mM glucosa (4,5 g/l) complementat amb:

Antibiòtics:	100 U/ml penicil·lina
	100 μg/ml estreptomicina
Hepes	25 mM
Calf Serum (CS)	10%

Medi de diferenciació 1:

DMEM amb 25 mM glucosa (4,5 g/l) complementat amb:

Antibiòtics:	100 U/ml penicil·lina
	100 μg/ml estreptomicina
Hepes	25 mM
Fetal Bovine Serum (FBS)	10%
Insulina	5 μg/ml
Dexametasona	0,25 μM
1-metil-3-isobutilxantina (IBMX)	0,5 mM

Medi de diferenciació 2:

DMEM amb 25 mM glucosa (4,5 g/l) complementat amb:

Antibiòtics:	100 U/ml penicil·lina
	100 μg/ml estreptomicina
Hepes	25 mM
Fetal Bovine Serum (FBS)	10%
Insulina	5 μg/ml

Medi de diferenciació 3 (FBS 10%):

DMEM amb 25 mM glucosa (4,5 g/l) complementat amb:

Antibiòtics:	100 U/ml penicil·lina
	100 μg/ml estreptomicina
Hepes	25 mM
Fetal Bovine Serum (FBS)	10%

Medi de dejuni:

DMEM amb 25 mM glucosa (4,5 g/l) complementat amb:

Antibiòtics:	100 U/ml penicil·lina
	100 μg/ml estreptomicina
Hepes	25 mM
BSA	0,2%

En cas d'utilitzar el medi per concentrar-lo el medi de dejuni no conté BSA (medi deplecionat)

Medi de congelació:

DMSO	10%
Fetal Bovine Serum (FBS)	90%

Aquest medi es prepara al moment i es refreda en gel.

Solució de tripsina-EDTA en PBS sense calci ni magnesi:

Tripsina	0,05% (w/v)
EDTA	0,02% (w/v)

3.1.2. PROTOCOL DE DIVISIÓ O SUBCULTIU

La divisió o subcultiu consisteix en la separació de les cèl·lules de la superfície on estan creixent gràcies a la utilització d'una proteasa (tripsina en el nostre cas) i la seva sembra (és a dir, col·locar-les sobre una superfície adequada on es puguin fixar i dividir) en un nombre més petit. L'objectiu d'aquest procés és, en primer lloc, obtenir un nombre de cèl·lules en el tipus de flascó o placa de cultiu adequats per tal de fer el experiments previstos i, en segon lloc, mantenir les cèl·lules en condicions de creixement òptimes.

PROCEDIMENT

1. Treure el medi de cultiu i rentar dues vegades amb PBS sense calci ni magnesi.
2. Afegir la solució de tripsina-EDTA (la quantitat varia segons la superfície amb la qual

estem treballant). Deixar que la proteasa actuï fins a observar l'aixecament de les cèl·lules de la superfície. Una vegada desenganxades totes les cèl·lules de la placa o flascó s'afegeix 5 vegades el volum que hem utilitzat de proteasa de CS 10%. És molt important que el temps de contacte de les cèl·lules amb la proteasa activa sigui mínim, ja que si això no és així es poden malmetre proteïnes de la superfície cel·lular i es podria provocar un canvi fenotípic.

3. Es recull tot el volum de líquid que conté les cèl·lules i es posa en un tub que se centrifuga a 1.000 x g durant 5 minuts.
4. Se n'elimina el sobrenedant i es resuspèn el precipitat en el volum que desitgem de CS 10%. A continuació, s'agafa una mostra i es compta el nombre de cèl·lules amb l'ajut d'una cambra de Neubauer.
5. Finalment se sembra el nombre de cèl·lules que interessi en plaques o flascons. Normalment se sembren de l'ordre de 160.000 cèl·lules per a una superfície de 56 cm^2.

3.1.3. PROTOCOL DE DESCONGELACIÓ

1. Es treu el criotub del nitrogen líquid i s'escalfa ràpidament a 37ºC (en un bany) per descongelar les cèl·lules. Quan el contingut del criotub és líquid es posa ràpidament el criotub en gel.
2. Es renta l'exterior del tub amb etanol i es transfereix el seu contingut a un tub de 15 ml on s'haurà posat 10 ml de medi de cultiu CS 10%.
3. Se centrifuga el tub durant 3 minuts a 250 x g i a temperatura ambient.
4. Se'n treu el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules precipitades en 5 ml de medi de cultiu CS 10% a 37ºC
5. Es transfereix tot el volum a un flascó de 25 cm^2 i s'incuba durant 16 hores en un incubador (amb el 5% CO_2 i el 95% d'humitat) a 37ºC.
6. Passat aquest temps, quan gairebé totes les cèl·lules estan enganxades, es canvia el medi de cultiu.

3.1.4. PROTOCOL DE CONGELACIÓ

1. Es desenganxen les cèl·lules de la superfície on estan creixent mitjançant tripsinització. Això cal fer-ho quan les cèl·lules estan gairebé confluents però encara en creixement exponencial.
2. Se centrifuguen les cèl·lules durant 3 minuts a 250 x g i a temperatura ambient.
3. Se n'extreu el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules a una densitat de 0,5-1 x 10^6 cèl·lules / ml en medi de congelació refredat en gel. Se'n fan parts alíquotes d'1ml en tubs de crioprotecció estèrils.
4. Es congelen els criotubs posant-los a –80ºC on es deixen 24 hores; passat aquest temps, es porten a un tanc de nitrogen líquid.

3.1.5. DETECCIÓ DE MICOPLASMA

El micoplasma és un paràsit intracel.lular que pot afectar els cultius cel·lulars sense mostrar aparentment indicis de contaminació. Per detectar la seva presència és aconsellable fer tests de micoplasma periòdicament. En el nostre laboratori s'utilitza el kit *EZ-PCR Mycoplasma Test Kit* (Biological Industries Co.) de detecció de micoplasma basat en l'amplificació per PCR d'un tros conservat i específic del gen que codifica per a l'RNA ribosòmic 16S.

3.2. DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES 3T3-L1

PROCEDIMENT

1. Els fibroblasts es mantenen en cultiu amb CS 10% i es deixa que arribin a confluència (aproximadament 5 dies). Dos dies després d'arribar a confluència (dia 0) es comença el protocol de diferenciació substituint el medi de cultiu dels fibroblasts pel medi de diferenciació 1.
2. Dos dies més tard es canvia el medi de diferenciació 1 pel medi de diferenciació 2.
3. Passats dos dies se substitueix el medi de diferenciació 2 pel medi de diferenciació 3 (FBS 10%). A partir d'aquest moment es mantenen les cèl·lules en FBS 10% canviant el medi cada 2 dies.
4. Les cèl·lules s'han considerat totalment diferenciades i amb fenotip d'adipòcits a partir del dia 10-11 de diferenciació. Aquestes cèl·lules diferenciades s'utilitzen durant les dues setmanes següents.

3.3. OBTENCIÓ DE MEMBRANES TOTALS DE FIBROBLASTS I ADIPÒCITS 3T3-L1

El protocol és molt semblant al de preparació de membranes a partir d'adipòcits aïllats o de teixit adipós de rata.

SOLUCIONS

HES (pH 7,4) (apèndix I)
HES (pH 7,4) + inhibidors de proteases (apèndix I)
Hepes 30 mM

PROCEDIMENT

1. Aquest protocol es duu a terme a partir d'adipòcits crescuts i diferenciats en plaques de 10 cm de diàmetre.
2. Després de mantenir les cèl·lules amb medi de dejuni durant dues hores, es posen les plaques en gel i es realitzen dos rentats amb 4 ml d'HES. En el cas de voler determinar l'efecte d'alguna molècula sobre components de la membrana, es poden incubar les plaques en les condicions desitjades abans o després del dejuni.
3. Acabat el segon rentat, amb l'ajut d'un *scraper*, s'arrenquen les cèl·lules amb 0,5-1 ml de HES + inhibidors de proteases i s'homogeneïtzen amb una agulla de 25 G, fent passar les cèl·lules 10 cops per la xeringa.
4. Es recull l'homogenat i se centrifuga a 1.000 x g (3.500 rpm en un rotor Sorvall SA-600) durant 5 minuts a 4ºC.
5. Es descarta el greix sòlid de la part superior del tub. Es recull el sobrenedant, es transfereix a un tub d'ultracentrifugadora de 10ml i es centrifuga a 200.000 x g (48.000 rpm, rotor Sorvall T-875) durant 75 minuts a 4ºC. El precipitat que s'obté, **membranes totals d'adipòcits o fibroblast 3T3-L1**, es resuspèn en 100-300 μl d'Hepes 30 mM.
6. Es valora la quantitat de proteïna recuperada, es fraccionen les resuspensions de cada mostra en parts alíquotes i es congelen amb nitrogen líquid. S'han de conservar a –80ºC.

3.4. RECOL·LECCIÓ I CONCENTRACIÓ DE MEDIS DE CULTIU

S'ha analitzat la presència d'SSAO en medis de cultiu d'adipòcits 3T3-L1. Atès que les cèl·lules 3T3-L1 es cultiven en medis on hi ha sèrum boví i aquest conté grans quantitats d'SSAO soluble, per a fer els estudis cal eliminar completament el sèrum dels medis de cultiu mitjançant una sèrie de rentats i preincubacions. Com que el sèrum és necessari per a la supervivència de les cèl·lules, aquestes no s'han cultivat més de dos dies en el medi deplecionat.

MATERIALS

- Tubs Centriprep (Amicon, Millipore, YM-10)
- Tubs Centricon (Amicon, Millipore, YM-10)

PROCEDIMENT

1. Adipòcits 3T3-L1 de 16-18 dies de diferenciació, que han crescut en plaques de 10 cm de diàmetre; es renten 4 vegades amb 10 ml de PBS (en el segon i quart rentat es deixa el PBS durant 10 minuts en contacte amb les cèl·lules).
2. Se substitueix el medi de cultiu per 10 ml de medi deplecionat, s'incuben les cèl·lules durant 1 hora les cèl·lules a 37ºC. Amb aquesta preincubació es pretén que la possible SSAO provinent del sèrum que es trobi enganxada a les cèl·lules o entre elles s'alliberi.
3. Passada l'hora de preincubació, es canvia el medi per 10 ml de medi deplecionat nou i s'afegeixen, a les plaques corresponents, les molècules que cal testar (calen 2 plaques per al tractament).
4. 24 o 48 hores després del tractament es recullen els medis d'incubació en tubs d'ultracentrífuga de 10 ml i se centrifuguen a 200.000 x g (48.000 rpm, rotor Sorvall T-875) durant 2 hores a 4ºC a fi d'eliminar-ne les possibles cèl·lules mortes que contaminarien la preparació amb SSAO de membrana plasmàtica.
5. El sobrenedant, 20 ml per condició experimental, es concentra usant tubs Centriprep fins a un volum de 2 ml per centrifugadora a 3.000 x g a 4ºC (rotor SA-600 o centrífuga de Falcons refrigerada).
6. El medi concentrat es transfereix a tubs Centricon i es concentra fins a un volum de 200 μl per centrifugació a 5.000 x g a 4ºC (rotor Sorvall SA-600). En cas que el volum obtingut després de la darrera centrifugació sigui inferior a 200 μl, aquest s'ajusta a 200 μl amb medi descartat de la preparació corresponent. El medis es guarden a -80ºC en dues parts alíquotes de 100 μl per evitar excessives descongelacions i recongelacions.

Nota: el temps de centrifugació és variable segons el medi, en general en el primer pas calen 3 centrifugacions de 30 minuts i, en el segon, una de 45 i dues de 30 minuts.

Nota 2: en cas de tractaments de les cèl·lules amb glucosa el protocol varia lleugerament. El medi de cultiu DMEM usat conté una alta concentració de glucosa, 25 mM. En aquest estudi es va voler estudiar l'efecte d'un tractament de glucosa 5 mM. Com que no es vol estudiar l'efecte de la glucosa sobre la diferenciació sinó sobre la secreció de l'SSAO, les cèl·lules es cultiven en el mateix medi que la resta. 48 hores abans de substituir el medi per medi deplecionat i afegir-hi les drogues, les plaques que han de rebre glucosa 5 mM es renten 4 cops amb PBS, com s'ha explicat per eliminar-ne el sèrum però aquest cop per eliminar-ne la glucosa, i el medi se substitueix per un DMEM sense glucosa (Gibco núm. 11966-025 amb L-glutamina, sense glucosa i sense piruvat sòdic) al qual s'afegeixen 5 mM de glucosa amb FBS al 10% (v/v). El dia en què s'inicien les incubacions per a la preparació de medis, aquestes plaques es processen igual que la resta (rentats i preincubació) però el medi usat sempre conté només 5 mM glucosa.

3.5. TRACTAMENTS AMB SIALIDASA I N-GLICOSIDASA

S'ha tractat tant medis de cultiu com membranes totals de 3T3-L1. La sialidasa o neuroaminidasa elimina els àcids siàlics de les proteïnes. La N-glicosidasa F o Endo F elimina les N-glicosilacions.

REACTIUS

- Vibrio cholerae sialidasa: 25 mU per 150-300 μg de proteïna o 50 μl medi (Roche, núm. 1 080 725)
- Peptide:N-glicosidase F: 1000 U per 40 μg de proteïna o 50 μl de medi (New England Biolabs, núm. 704S). A més, conté:
  - Tampó de desnaturalització 10X: 5% SDS, 10% β-Mercaptoethanol
  - Tampó G7 10X: 0,5 M fosfat de sodi a pH 7,5
  - 10% NP-40

PROCEDIMENT N-GLICOSIDASA

1. Es desnaturalitzen les proteïnes amb el tampó de desnaturalització a 100ºC durant 10 minuts.
2. S'hi afegeix 1/10 part del volum total de tampó G7 10X i NP-40 10%.
3. S'hi afegeix la quantitat de PNGasa F requerida i s'incuba durant 2 hores a 37ºC.

PROCEDIMENT SIALIDASA

1. S'incuba la mostra de membranes o medi amb la quantitat de sialidasa necessària durant 2 hores a 37ºC.

Les mostres tractades s'analitzen per tranferència *Western blot* i es comparen les diferències de mobilitat entre elles i amb mostres no tractades.

4. VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

4.1. MÈTODE DE BRADFORD

Si no s'especifica una altra cosa s'ha emprat el mètode de Bradford, basat en el canvi de color del blau brillant de Comassie en resposta a diferents concentracions de proteïna (Bradford, 1976). En una solució àcida, el blau brillant de Comassie G-250 quan es lliga a proteïnes canvia el màxim d'absorbància de 465 a 595 nm.

MATERIALS

- Cubetes de plàstic d'1,5 ml de capacitat
- Espectrofotòmetre Shimadzu

SOLUCIONS

Solució comercial *Bio-Rad Protein Assay* de la casa Bio-Rad. (Blau brillant de Coomassie, àcid fosfòric i metanol). Conservada a 4ºC.

Gamma-globulina bovina (0,1%). Usada com a patró diluïda en tampó fosfat pH 7,4, (Na_2HPO_4 50 mM, NaH_2PO_4 50 mM) i conservada a -20ºC.

PROCEDIMENT

1. Es dilueix la quantitat necessària de reactiu *Bio-Rad* 5 vegades amb aigua bidestil·lada.
2. En cubetes d'espectrofotòmetre d'un sol ús es prepara per duplicat un patró amb la solució de gammaglobulina 1 mg/ml: 0, 5, 10, 15 i 20 μg de proteïna.
3. En cubetes d'espectrofotòmetre i per duplicat es dipositen 2,5-10 μl de les mostres a valorar i s'afegeix a les cubetes 1 ml de reactiu de Bio-Rad diluït. Aquestes s'agiten per inversió i passats 5 o10 minuts es fan les lectures d'absorbància a 595 nm.

4.2. MÈTODE BCA

Atès que el mètode Bradford no es pot utilitzar quan les mostres contenen detergents s'ha emprat el kit de Pierce basat en la reducció de Cu^{2+} a Cu^{1+} que provoquen les proteïnes en un medi alcalí (reacció de Biuret). La detecció del catió Cu^{1+} es realitza mitjançant el reactiu àcid bicinconínic (BCA) ja que la quelació del coure per dues molècules de BCA dóna un producte de color porpra que presenta un pic d'absorbància a 562 nm.

MATERIALS

- Plaques d'ELISA: *96 well EIA/RIA Plate*, Costar
- Lector d'ELISA: *BioWhittaker Microplate Reader 2001*

SOLUCIONS

Kit *BCA protein assay* de la casa Pierce (Assay Reagent 23225)
BSA 2 mg/ml

PROCEDIMENT

1. Es barregen els reactius A i B del kit en proporció 50:1.
2. En plaques de micropous (plaques ELISA) s'afegeixen 20 μl de cada mostra patró (0, 5, 10, 15 i 20 μg) o problema per duplicat. Seguidament s'afegeix a cada pou 200 μl de la barreja de reactius.
3. Es cobreix la placa i es deixa incubant a 37ºC durant 30 minuts.
4. Passat el temps d'incubació es mesura l'absorbància amb un lector d'ELISA amb el filtre corresponent.

5. MESURA DE L'ACTIVITAT AMINO-OXIDASA

L'SSAO catalitza una reacció oxidativa de desaminació d'amines primàries la qual produeix l'aldehid corresponent, peròxid d'hidrogen i amoni:

$$\mathbf{R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 + O_2 + H_2O \longrightarrow R\text{-}CHO + H_2O_2 + NH_3}$$

En aquesta tesi s'han utilitzat dos tipus de tècniques per a mesurar l'activitat amino-oxidasa de diferents teixits animals i de cèl·lules en cultiu.

La mesura de l'activitat amino-oxidasa ens ha servit per a diferents objectius:

- Assajar l'activitat present en extractes o membranes de diferents teixits, generalment teixit adipós o adipòcits aïllats, però també en múscul esquelètic i illots pancreàtics, en extractes i membranes totals o medis de cultiu de cèl·lules 3T3-L1 i en plasma de rata. Per tal de:
    - Comparar les activitats i les constats cinètiques de diferents fonts d'SSAO.
    - Comparar en una mateixa font d'SSAO com es modifica l'activitat després d'incubacions amb diferents molècules, fàrmacs o hormones.

- Assajar si diferents amines són substrat de l'SSAO basant-nos en la seva capacitat per competir amb la benzilamina (assaig radiomètric) o en la capacitat de produir H_2O_2 (assaig espectrofotomètric); i calcular les constants cinètiques dels nous substrats.

El protocol general dels assaigs ha experimentat modificacions segons l'objectiu seguit i la procedència de l'SSAO. A continuació es detallen el dos protocols generals i s'indiquen les modificacions aplicades en cada cas.

Aquests tipus d'assaigs, usant com a substrat la benzilamina, permeten detectar tant l'activitat SSAO com l'activitat monoamino-oxidasa, MAO, per això es recomana l'ús de l'inhibidor de MAO, pargilina. En el nostre cas, però l'inhibidor no ha estat afegit a cada tub d'assaig sinó que per cada mostra s'ha fet un tub on s'afegeix l'inhibidor d'SSAO, semicarbazida. En aquest tub tenim una mesura de l'oxidació deguda a altres activitats amino-oxidasa i de l'oxidació no enzimàtica, aquest valor s'ha de restar de l'oxidació total produïda per l'SSAO a cada mostra.

En cas de voler caracteritzar l'enzim responsable de l'oxidació d'un substrat en una mostra determinada es mesura l'activitat amino-oxidasa en presència de diferents inhibidors per separat o conjuntament. Per exemple, per determinar l'oxidació deguda a la MAO, es mesura l'oxidació en presència de semicarbazida 1 mM i per mesurar l'activitat SSAO es mesura l'activitat en presència de pargilina 10 μM. En presència de pargilina 10 μM i semicarbazida 1 mM es considera que tant les dues isoformes de la MAO (A i B) com l'SSAO estan inhibides, per tant, es té una mesura de l'oxidació no enzimàtica del substrat.

5.1. ASSAIG RADIOMÈTRIC

La tècnica utilitzada és una modificació del mètode d'Otsuka i Kobayashi (Otsuka and Kobayashi, 1964) i es basa en l'extracció dels productes de la reacció d'oxidació amb un solvent orgànic a pH àcid. A pH àcid, els aldehids no estan càrregats i són solubles en un solvent orgànic, mentre que les amines queden retingudes a la fase aquosa on ha tingut lloc la reacció (Fowler and Tipton, 1981).

El mètode consisteix en la incubació de l'enzim amb un substrat marcat amb ^{14}C durant un temps determinat, posteriorment s'atura la reacció amb HCl. El producte de la reacció, l'aldehid format, se separa del substrat, i la seva concentració es determina mitjançant el comptatge en un comptador de partícules β.

SOLUCIONS

Tampó fosfat sòdic 200 mM (pH 7.4)

$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	13,79 g / 500ml
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	17,79 g / 500ml

HCl (4N)
Barreja d'extracció: toluè:etilacetat 1:1 (v/v)

Substrats freds: Benzilamina 25, 50 o 100 μM, tiramina 500 μM i amines a provar a 100 μM normalment.

La benzilamina s'ha usat a una concentració de 100 μM en els assaigs de competència amb altres amines, a 25 μM en els assaig amb medis de cultiu de 3T3-L1 i a 50 μM amb els plasmes de rata. Per tal de caracteritzar les constants cinètiques s'ha usat un patró de concentracions de 5-1000 μM.

Les amines a testar estan en pols, moltes són tòxiques i s'han de pesar amb mascareta i guants; cal treballlar a la campana. Es preparen solucions a 40 mM i es congelen parts alíquotes a –20ºC per evitar congelacions i descongelacions repetides.

Solució radioactiva: ^{14}C -Benzilamina–HCl 250 μCi/ml.

En el cas dels assaigs amb membranes es prepara una solució 4 vegades més concentrada de benzilamina i s'hi afegeixen 10 μl de substrat radioactiu per 1 ml de substrat fred.

Per als assaigs amb SSAO soluble es prepara una solució 10 cops més concentrada de benzilamina (250 μM) i s'hi afegeixen 40 μl de substrat radioactiu per 1 ml de substrat fred (s'ha augmentat la proporció de substrat calent enfront del substrat fred a fi d'augmentar la sensibilitat de detecció).

Inhibidors: Semicarbazida 1 mM i pargilina 10 μM.

Els inhibidors es dilueixen amb aigua bidestil·lada i es guarden a una concentració de 0,1 M en alíquotes a –20^{o}C.

Font d'SSAO:

Les membranes, sèrums i medis concentrats es troben congelats a -80ºC i s'han de descongelar a poc a poc en gel per evitar que les activitats enzimàtiques es malmetin.

Les membranes de teixit adipós humà obtingudes del laboratori de Toulouse estan congelades amb tampó de lisi, cal afegir 20 ml de tampó fosfat i centrifugar 20 minuts a 4.000 x g (1.650 rpm) a 4ºC amb el rotor SA-600. Després s'han de resuspendre en el volum desitjat de tampó fosfat.

Les quantitats de proteïna utilitzades han estat de 5 a 50 μg en el cas de membranes d'adipòcits de rata i de 10 a 50 μg en el cas de 3T3-L1, diluïdes en tampó fostat. Per mesurar activitats de la forma soluble s'han usat volums de 20 μl pels medis de 3T3-L1 i de 40-125 μl pel plasma de rata.

PROCEDIMENT

1. L'assaig es realitza en tubs Eppendorf, en un bany a 37^{o}C amb agitació suau constant. Per determinar l'activitat de cada mostra es realitza un mínim de dues mesures. En un primer tub es mesura l'activitat SSAO i, en un segon tub, on s'afegeix semicarbazida, es mesura l'oxidació no deguda a SSAO.
2. S'afegeix als tubs la font d'SSAO, el tampó fosfat i als tubs d'inhibició la semicarbazida.
3. S'incuben els tubs 15 minuts a 37ºC perquè l'activitat SSAO s'inhibeixi.
4. Passat el temps de preincubació, s'afegeix el substrat i es deixen incubar els tubs entre 30 minuts i 1 hora. Igual que la concentració final de substrat, els temps d'incubació depèn de les condicions de la mostra i l'activitat oxidasa (Km i Vmax) esperada. En el cas de fer l'assaig amb preparacions de membrana s'ha incubat durant 30 minuts, i com que es treballa amb la forma soluble de l'SSAO, les incubacions s'han fet durant d'una hora.
5. Per aturar l'activitat enzimàtica s'afegeix a cada tub 50 μl de HCl 4 N i es deixen un parell de minuts més a 37ºC. Seguidament s'afegeix 1 ml de la barreja d'extracció, es tapen els tubs i es deixen en un agitador d'Eppendorf durant un mínim de 15 minuts amb agitació forta. En aquest punt l'aldehid es solubilitza en el solvent orgànic separant-se del substrat. Per afavorir la separació de totes dues fases, es poden centrifugar els tubs Eppendorfs durant 2 minuts a 13.000 x g en la centrifugadora de sobretaula.
6. Sota campana, es pipetegen 0,7 ml de la fase orgànica i es posen en vials amb 5 ml de líquid d'escintil·lació. Perquè resulti més fàcil l'obtenció de la fase orgànica, es poden deixar els tubs 2 hores a –20^{o}C, de manera que la fase aquosa es congela i la fase orgànica no.

Volums i concentracions usades en els diferents experiments:

- **Assaig de competència:**

  - 50 μl de membranes en tampó fosfat que contenen la concentració de proteïnes desitjada.
  - 50 μl de benzilamina 400 μM (100 μM final), 10 μl radioactivitat / ml solució.
  - 50 μl d'amina 400 μM o 4 mM (100 μM o 1 mM final, respectivament).
  - 50 μl de semicarbazida 4 mM (1 mM final) o tampó fosfat (tubs sense inhibició).

- **Assaig amb medis de cultiu:**

  - 20 μl de medi de cultiu.
  - 20 μl de benzilamina 250 μM (25 μM final), 40 μl radioactivitat / ml solució.
  - ± 20 μl de semicarbazida 10 mM (1 mM final).
  - tampó fosfat fins a 200 μl.

  Nota: les membranes de 3T3-L1 (10 μg) assajades en paral·lel es dilueixen fins a un volum de 20 μl en tampó fosfat i es posen enlloc del medi de cultiu

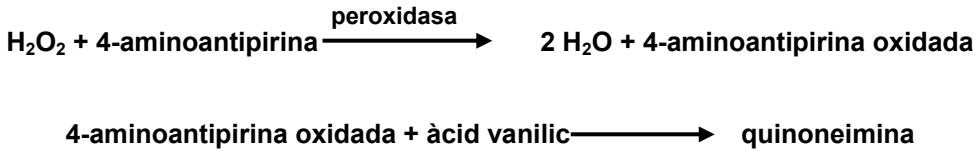
- **Assaig amb sèrums:**

  - 40 μl de medi de sèrum rates STZ, 125 μl medi de sèrum de rates GK.
  - 20 μl de benzilamina 500 μM (50 μM final), 40 μl radioactivitat / ml solució.
  - ± 20 μl de semicarbazida 10 mM (1 mM final).
  - tampó fosfat fins a 200 μl.

  Nota: quan en l'assaig es caracteritzen les concentracions cinètiques del substrat se substitueix la concentració indicada pel rang establert.

5.2. ASSAIG ESPECTROFOTOMÈTRIC

El mètode es basa en la detecció del H_2O_2 produït en la reacció catalitzada per l'SSAO o altres activitats amino-oxidasa, mitjançant el mètode descrit per Holt i col·laboradors (Holt *et al.*, 1997) on es forma un producte acolorit (quinoneimina) que es pot detectar llegint-lo amb un espectrofotòmetre a 498 nm:



El mètode permet fer una mesura contínua de la producció de H_2O_2, quan s'utilitzen cubetes d'espectrofotòmetre d'un sol ús. En aquest treball hem utilitzat una adaptació del mètode per fer mesures en una placa d'ELISA.

Aquest mètode només l'hem usat amb membranes de teixit adipós en el cas humà i de ratolí, i de teixit adipós o adipòcits aïllats en el cas de la rata, amb l'objectiu d'identificar nous substrats de l'SSAO i de caracteritzar les constants cinètiques d'aquests i de la benzilamina en les diferents espècies.

SOLUCIONS

Tampó fosfat potàssic: TPK 0,2 M a pH 7,6 (KH_2PO_4:K_2HPO_4 en proporció 1:4).
Àcid vanílic (Sigma) 10 mM en tampó fosfat.
Aminoantipirina (Sigma) 5 mM en tampó fosfat.
Peroxidasa (Sigma, tipus 2, rave) 60 U/ml en tampó fosfat.

Solució cromogènica, es prepara diàriament i es guarda a 4ºC, per 1 ml:

- 100 μl àcid vanílic (1 mM)
- 100 μl aminoantipirina (500 μM)
- 66 μl peroxidasa (4 U/ml))
- 734 μl tampó fosfat

Mescla de reacció:

- 30 μl solució cromogènica (0,6 U/ml peroxidasa 150 μM àcid vanílic 75 μM aminoantipirina).
- 20 μl semicarbazida (1 mM, s'afegeix 10 cops concentrada) en els pous on calgui.
- 20 μl substrat: benzilamina (100 μM a rata/ratolí i 1 mM a humà o rang de concentracions per caracterització cinètica, afegida x10) o noves amines (x10).
- Font d'SSAO
- Tampó fostat fins a 200 μl.

PROCEDIMENT

1. Es prepara el volum desitjat de solució cromogènica i es manté en fred
2. S'omple la placa d'ELISA amb el volum de mostra que correspongui a la quantitat de proteïnes desitjada i el tampó fosfat.
3. Es fa una primera mesura a 490 nm que correspon a l'absorbància inespecífica deguda a les membranes (blanc).
4. S'afegeix l'inhibidor en els pous corresponents i es realitza una preincubació de 20 minuts a 37ºC. La lectura d'aquests pous ens indica l'oxidació inespecífica no deguda a SSAO.
5. S'hy afegeix la solució cromogènica i tot seguit s'hi afegeix el substrat per a iniciar la reacció.
6. S'incuba entre 30 minuts i 1 hora a 37ºC
7. Es llegeix l'absorbàcia amb un lector d'ELISA a 492 nm.

Nota: per tenir la producció de H_2O_2 específica de cada mostra cal restar a aquest darrer valor l'absorbància inespecífica de les mostres (blanc) i l'absorbància deguda a una activitat diferent de l'SSAO (pous amb semicarbazida)

6. ESTUDIS DE L'ESTAT DE FOSFORILACIÓ DE LES PROTEÏNES DELS ADIPÒCITS

En aquesta tesi s'han fet diversos estudis sobre l'estat de fosforilació en adipòcits degut als efectes que el vanadat i el peroxovanadat tenen sobre les proteïnes tirosina-fosfatasa i la importància d'aquestes en el metabolisme general de la cèl·lula.

El vanadat s'ha utilitzat en molts dels estudis *in vivo* i *in vitro* i el peroxovanadat es la molècula generada *in situ* en presència de benzilamina i vanadat per l'acció de l'SSAO. A continuació s'explica el procés de producció de peroxovanadat que hem seguit quan ha estat necessari afegir-lo externament per utilitzar-lo com a control.

Preparació de peroxovanadat:

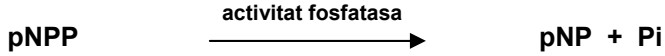
1. Es mescla H_2O_2 (Sigma) i vanadat a la mateixa concentració.
2. Es deixa durant 10 minuts a temperatura ambient i es col·loca en gel.

Nota: sempre es prepara just abans de ser utilitzat.

6.1. ACTIVITAT PROTEÏNA TIROSINA-FOSFATASA

La detecció de l'activitat fosfatasa s'ha fet en dos tipus de mostres; en extractes totals de teixit adipós de rates diabètiques de tipus 1 que havien estat sota un tractament crònic (procediment A) i en extractes totals d'adipòcits aïllats de rates no diabètiques incubats en presència de diferents fàrmacs (procediment B).

El protocol utilitzat es basa en el mètode descrit per Kremerskothen i Barnekow (Kremerskothen and Barnekow, 1993) on s'avalua l'activitat fosfatasa present en una mostra per la capacitat que presenta per hidrolitzar el p-nitrofenil fosfat (pNPP). En l'hidrolitzar-se aquest compost forma p-nitrofenil (pNP), que absorbeix a 405 nm i es pot determinar el grau d'hidròlisi amb un espectrofotòmetre. El mètode s'ha adaptat per poder treballar amb volums de 200 μl i utilitzar un lector d'ELISA.



Està descrit que el vanadat és un inhibidor competitiu de les proteïnes tirosina-fosfatasa i que l'ús d'EDTA pot impedir aquesta inhibició ja que és capaç de quelar-lo. En canvi el peroxovanadat, un inhibidor irreversible de les proteïnes tirosina-fosfatasa no es veu afectat per l'EDTA. L'agent antioxidant DTT és capaç, en canvi, d'evitar l'oxidació produïda per peroxovanadat ja que el redueix a vanadat, ara bé, un cop produïda l'oxidació de la cisteïna del centre catalític de les proteïnes tirosina-fosfatasa per acció del peroxovanadat el DTT no és capaç de revertir-la. En el procediment B s'ha usat DTT; s'ha fet perquè aquest reverteix l'oxidació que l'oxigen i altres agents oxidants diferents del peroxovanadat produeixen sobre els proteïnes-fosfatasa durant el procés de manipulació i preparació de la mostra. D'aquest manera es treballa amb basals menys elevats i les diferències causades pel peroxovanadat s'observen més fàcilment. El DTT també pot revertir l'oxidació produïda per vanadat.

MATERIALS

- p-nitrophenil (pNP) (Sigma)
- p-nitrophenilphosphate (pNPP) (Sigma) 50 mM
- EDTA (àcid etilendiaminotetraacètic) (Calbiochem) 10 mM
- DTT (ditiotreitiol) (Sigma) 20 mM

PROCEDIMENT A: a partir de teixit adipós

1. Es renta el teixit adipós congelat amb 2 ml de tampó d'homogeneïtzació (sense EDTA), es trosseja amb unes tisores, s'homogeneïtza durant 20 segons amb el politró (400 μl de teixit per animal en 1,5 ml de tampó) i es centrifuga durant 5 minuts a 5.000 rpm i 4ºC a fi d'eliminar-ne el greix.
2. La determinació es fa en placa d'ELISA en 200 μl totals de tampó Tris 10 mM a pH 7,5 i s'afegeix amb aquest ordre:
   - Tampó Tris (120 o 140 μl segons el pou)
   - 20 μl d'EDTA 10 mM (1mM final) en els pous corresponents. Per a cada mostra s'inclou un pou on s'afegeix EDTA.
   - 60 μg de proteïnes, provinents de lisats de teixit adipós i continguts en 50 μl de tampó Tris.
   - 20 μl de pNPP 50 mM (5 mM final).
3. S'inclou també una patró de pNP (5 μM, 50 μM, 500 μM, 1 mM, 3 mM i 5 mM) i un punt on s'afegeix externament vanadat 500 μM com a control positiu.
4. Es deixa incubar la reacció durant 30, 45 o 60 minuts a 37ºC.
5. Es llegeix l'absorbància a 405 nm.

Tampó d'homogeneïtzació (50 ml):

Hepes 50 mM pH 7,4	2 ml d'1,25M
PMSF 1mM	500 μl de 0,1M
Leupeptina 2 μM	52,5 μl de 2 mM
Aprotinina 1U/ml	500 μl de solució comercial (4,7 U/mg)

PROCEDIMENT B: a partir d'adipòcits aïllats

1. S'incuba la preparació d'adipòcits aïllats (1/10 de *packet cells*) amb els fàrmacs indicats durant 15, 30 o 45 minuts a 37ºC.
2. Es renten els adipòcits 3 vegades amb tampó incomplet (tampó d'incubació sense albúmina). En cada rentat s'afegeixen 15 ml de tampó; s'espera que els adipòcits surin i se n'extreu el tampó de l'infranedant.
3. Es canvia el tampó d'incubació per tampó d'homogeneïtzació (dilució 1/2 dels adipòcits).
4. S'homogeneïtza utilitzant el politró durant 15 segons i mantenint les cèl·lules en gel.
5. Se centrifuga 20 minuts a 15.000 rpm a 4ºC, a fi d'eliminar-ne el greix i el material no digerit. Se'n poden guardar parts alíquotes a -80ºC o realitzar la mesura directament.
6. Es valora la quantitat de proteïnes i es dilueixen per tenir una solució que contingui 20 μg de proteïna en 60 μl de tampó Tris 10 mM a pH 7,5.
7. La mesura de l'activitat fosfatasa es fa afegint-hi pNPP i procedint com al protocol A però afegint-hi ara DTT 2 mM en lloc d'EDTA en els pous corresponents.

Tampó d'homogeneïtzació (200 ml) pH 7,5:

Tris	10 mM	4 ml de 0,5M
EDTA	1 mM	1 ml de 0,2 M
Leupeptina	2 μM	200 μl de 2 mM
Pepstatina	1 μM	200 μl de 1 mM
PMSF	1 mM	2 ml de 0,1 M
Aprotinina	1 U/ml	4 ml
Benzamidina	25 mM	780 mg

6.2. PERFIL DE FOSFORILACIÓ EN TIROSINES

El perfil de fosforilació en tirosines ha estat analitzat en dos tipus de mostres, les mateixes on s'ha analitzat l'activitat fosfatasa (punt 6.1).

Per tal d'analitzar el perfil de fosforilació del teixit adipós de les rates que han estat sotmeses a un tractament crònic se'n realitza un extracte total i s'analitza per tranferència *Western blot* usant un anticòs antiresidus de tirosina fosforilats. Com que es vol conservar l'estat de fosforilació que el teixit presentava en el moment del sacrifici dels animals i la congelació del teixit, s'utilitza un tampó d'homogeneïtzació que conté, a més dels habituals inhibidors de proteases, inhibidors de fosfatases (apèndix I). L'obtenció dels homogenats de teixit adipós i la tranferència *Western blot* es realitzen tal com s'explica als apartats corresponents.

En el cas de la determinació del perfil de fosforilació en tirosines en homogenats d'adipòcits aïllats, es realitza primer la incubació dels adipòcits (4 ml de solució d'adipòcits 1/10) en condicions basals o en presència d'insulina 100 nM, vanadat 100 μM i/o benzilamina 100 μM i tot seguit s'homogeneïtzen els adipòcits amb 750 μl de tampó amb inhibidors de fosfatases (apèndix I) i s'analitza el perfil de fosforilació per tranferència *Western blot* utilitzant 100 μg de proteïna per condició. L'obtenció de l'homogenat total i la tranferència *Western blot* es realitzen com s'explica als apartats corresponents.

6.3. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES FOSFORILADES EN TIROSINA AMB UN ANTICÒS MONOCLONAL ESPECÍFIC

En el cas de les rates diabètiques de tipus 2 que havien estat tractades crònicament, es va voler estudiar l'estat d'activació d'alguns components de la via de senyalització de la insulina. Per això, es van preparar adipòcits a partir de teixit adipós d'aquests animals i després d'homogeneïtzar-LO es va immunoprecipitar amb anticòs PY20, anticòs contra la subunitat p85 de la PI3K (fosfoinositol-3-quinasa) (Transduction Laboratories P11120).

Aquest protocol conté una sèrie de passos:

- ***Preparació de les boletes de proteïna G-sefarosa.***
- ***Preparació i solubilització de la mostra***: es tracta de solubilitzar amb una barreja de detergents els lisats d'adipòcits que es volen immunoprecipitar.
- ***Immunoprecipitació***: és el pas en el qual es posa en contacte la mostra solubilitzada amb el conjugat, l'anticòs i la proteïna G-sefarosa. En aquest pas es formen els immunocomplexos.
- ***Processament dels precipitats i sobrenedants:*** és la fase en la qual se separen les proteïnes que s'han lligat a l'anticòs de les que no ho han fet, de manera que se n'obtenen dues fraccions: el sobrenedant i el precipitat. Aquestes dues fraccions obtingudes es tracten amb LSB per poder càrregar-les en un gel de SDS-poliacrilamida.

SOLUCIONS

PBS
Proteïna G-sefarosa (Sigma)
Anticòs anti-PI3-Kinasa p85 (Upstate biotechnology, rabbit)
NP40 10%

Tampó *stop* (37ºC):

Hepes	50 mM
EDTA	10 mM
Na Cl	150 mM
$Na_4P_2O_7$	10 mM
NaF	100 mM
Vanadat	2 mM

Tampó homogeneïtzació (tampó *stop* + inhibidors de proteases) (temperatura ambient):

Tampó *stop*	
Pepstatina	2 μM
Leupeptina	2 μM
PMSF	0,5 mM

Tampó rentat (4ºC):

Tampó homogeneïtzació
NP40 1%

PROCEDIMENT

Preparació de les boletes de proteïna G-sefarosa:

1. Per a cada condició es necessiten 30 μl de boletes de proteïna G-sefarosa. S'afegeix el volum total necessari de boletes en un tub Eppendorf i es renta 3 vegades amb 1 ml de PBS, mesclant per inversió, fent una centrifugació de 6 segons en una microfuga i enretirant-ne el sobrenedant després de cada rentat.
2. Acabat l'últim rentat es porta la proteïna G-sefarosa a un volum final de 50 μl per condició inicial amb tampó de rentat.

Nota: les boletes de proteïna G-sefarosa, estan en una solució comercial que conté etanol, el volum de 30 μl necessari per condició és de proteïna seca, per tant, s'ha de mirar quin és el volum de suspensió que cal pendre perquè contingui el volum de proteïna G desitjat (en el nostre cas, per exemple, la suspensió de 7 ml contenia 5 ml de boletes, per tant, per tenir 30 μl per condició calia agafar 42 μl). Les boletes s'han de pipetejar sempre amb una punta tallada per no malmetre-les.

Preparació d'extractes i solubilització:

1. Acabada la incubació dels adipòcits aïllats amb els agents corresponents (750 μl d'adipòcits aïllats de rates GK incubats en presència o absència d'insulina 100 mM), es realitzen tres rentats amb 6 ml de tampó *stop*.
2. Després de l'últim rentat s'afegeixen 6 ml de tampó d'homogeneïtzació i tot seguit s'aspira el tampó fins a deixar un volum total d'1,5 ml (750 μl d'adipòcits i 750 μl de tampó).
3. Es realitza l'homogeneïtzació utilitzant una xeringa d'insulina fent-hi passar els adipòcits 10 cops.
4. Se centrifuguen els homogenats durant 5 minuts a 5.000 rpm i 4ºC per tal d'eliminar-ne el greix.
5. S'afegeix NP4O 1% final (v/v) i es deixa l'homogenat 1 hora en agitació orbital i a 4ºC a fi que se solubilitzi.
6. Se centrifuga durant 20 minuts a 13.000 rpm i 4ºC per tal d'eliminar-ne les restes de material no solubilitzat.
7. Se'n recull el sobrenedant i es valora la concentració de proteïnes mitjançant el mètode Pierce i utilitzant 10 i 20 μl de sobrenedant per duplicat. Aquest pas serveix per establir el volum de mostra que es necessita per immunoprecipitar 500 μg de proteïnes.

Immunoprecipitació i obtenció de les fraccions de precipitat i sobrenedant:

1. S'ajusten totes les preparacions de mostra al volum de la més diluïda amb tampó de rentat, s'afegeixen 5 μl d'anticòs anti-p85 i es deixa 90 minuts en gel.
2. S'afegeix a cada preparació els 50 μl de boletes preparades i es deixa en agitació orbital 90 minuts.
3. Es centrifuga 6 segons a una microfuga, es recull el sobrenedant de la immunoprecipitació i es diposita en un nou tub Eppendorf en el qual s'afegeix un volum de LSBx3 equivalent a la meitat del volum de sobrenedant recollit. Després d'afegir DTT 2 M fins una concentració final de 0,1 M i de bullir el tub Eppendorf **el sobrenedant de la immunoprecipitació** estarà preparat per ser corregut en un gel de SDS-poliacrilamida. El sobrenedant serveix de control del material no immunoprecipitat.
4. Es renta el precipitat de boletes amb les proteïnes específiques unides 4 vegades amb 1 ml de tampó de rentat i s'afegeixen 30 μl LSBx1 al precipitat. S'afegeix DTT 2 M fins a una concentració final de 0,1 M, es bull el tub Eppendorf durant 5 minuts i es fa una centrifugació de 6 segons en una microfuga. Amb l'ús d'una pipeta Hamilton de vidre es pot recollir **el precipitat de la immunoprecipitació** ja preparat per ser càrregat en un gel de SDS-poliacrilamida.

6.4. ACTIVITAT PROTEÏNA-QUINASA B (PKB)

Els experiments sobre l'estat d'activació de la proteïna-quinasa B (PKB) s'han fet en col·laboració amb el Dr. Jose Miguel Lizcano de la Universitat de Dundee (Escòcia) i consten de tres passos: primerament cal incubar els adipòcits amb les substàncies que es volen testar i preparar-ne homogenats. Després, per a comprovar l'estat d'activació de la PKB s'analitza d'una banda l'activitat PKB α i γ i de l'altra s'analitza el nivell de fosforilació de la serina 473 (Ser) i la treonina 308 (Thr). Per tal que PKB sigui activa cal que estigui fosforilada en aquests dos residus, la fosforilació de la Thr 308 és la que es postula fosforilada per la PDK-1, mentre que la Ser 473 es fosforila per la proteïna PDK-2 que encara no ha estat clonada.

MATERIALS I SOLUCIONS

Anticossos (Walker *et al.*, 1998):

PKB α: generat contra el fragment contingut entre els residus 1-149 de la proteïna de humana (Upstate Biotechnology núm. 05-591) que reconeix la proteïna humana i de rata.

PKB γ : generat contra el fragment contingut entre els residus 116-128 de la proteïna de rata (RMNCSPTSQIDNI) (Upstate Biotechnology núm. 06-607) que reconeix la proteïna humana, de rata i de ratolí.

Crosstide: GRPRTSSFAEG

Tampó d'homogeneïtzació Tris amb inhibidors de proteases i fosfatases (apèndix I)

Tampó d'incubació: 50 mM Tris pH 7,5, 0,1% b-mercaptoetanol

Inhibidor de la proteïna-quinasa A: TTYADFIASGRTGRRNAIHD

Proteïna G-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech)

PROCEDIMENT

Incubació dels adipòcits i preparació dels homogenats:

1. S'incuben a 37ºC 400 μl d'adipòcits aïllats de rata diluïts en un volum final de 4 ml de tampó KRHBA amb 100 nM insulina durant 5 minuts o durant 30 minuts amb 100 μM benzilamina, 100 μM vanadat o la combinació de tots dos en absència o presència d'1 mM de semicarbazida.
2. Un cop acabada la incubació es renten els adipòcits amb 8 ml de tampó incomplet (KRHB) que conté inhibidors de fosfatases (1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM ortovanadat sòdic, 50 mM NaF i 5 mM pirofosfat sòdic).
3. Se n'aspira l'infranedant i s'hi afegeixen 750 μl de tampó d'homogeneïtzació Tris amb inhibidors de proteases i fosfatases als adipòcits.
4. Es lisen els adipòcits per congelació ràpida en nitrogen líquid i descongelació. Seguidament es passen 5 cops per una de 25 G.
5. Se centrifuguen els homogenats durant 10 minuts a 15.000 rpm i 4ºC a fi d'eliminar-ne el material no disgregat i el greix. Els sobrenedants s'aliqüoten i es congelen amb nitrogen líquid; posteriorment es guarden a -80ºC.

Mesura de l'activitat PKB α i γ dels homogenats:

1. S'incuben, en un tub Eppendorf, 5 μg de l'anticòs i 5 μl de proteïna G-Sepharose durant 30 minuts i a 4ºC amb agitació contínua.
2. Se centrifuga la mescla a 13.000 rpm durant un minut i el precipitat es renta dues vegades amb tampó d'homogeneïtzació a fi d'eliminar-ne l'anticòs que no s'ha unit a

les boletes de sefarosa.

3. S'hi afegeixen 100 μg d'homogenat d'adipòcits i s'incuba durant dues hores a 4ºC i en agitació contínua.
4. Se centrifuga a 13.000 rpm durant un minut i es renta dues vegades amb tampó d'homogeneïtzació + 0,5 M NaCl i dos cops més amb tampó d'incubació.
5. L'activitat es mesura en un volum final de 50 μl que inclou tampó d'incubació, 0,1 mM EGTA, 10 mM acetat magnèsic, 2,5 μM inhibidor de proteïna A i 30 μM del substrat Crosstide. La reacció s'inicia amb l'addició de 500 cpm/pmol de γ-32P-ATP a una concentració final de 100 μM. La incubació es realitza durant 30 minuts.
6. S'atura la reacció agafant 40 μl de la mescla d'incubació que es posen en un paper de fosfocel·luLOa P81 (2 x 2 cm, Whatmann).
7. Es renten papers successivament amb una solució de 0,5% d'àcid ortofosfòric.
8. Es deixen assecar els papers amb acetona i es compten durant 30 segons en un comptador Cherenkov.

Nota: el mètode es basa en la utilització de substrats bàsics que queden retinguts en el paper de fosfocel·luLOa.

7. IMMUNOLOCALITZACIÓ PER A MICROSCÒPIA ÒPTICA

Les tècniques d'immunolocalització es basen en la utilització d'anticossos per detectar proteïnes específiques. En aquesta tesi s'han fet immunolocalitzacions de làmines de membrana plasmàtica d'adipòcits aïllats provinents de rates no diabètiques i rates diabètiques de tipus 2 després d'un tractament crònic i incubades en absència o presència d'insulina.

S'ha emprat una tècnica d'immunolocalització indirecta, és a dir, s'han revelat els complexos antigen-anticòs primari amb un anticòs secundari marcat, en el nostre cas amb un compost fluorescent. La tècnica d'immunofluorescència inclou una sèrie d'incubacions prèvies a la incubació amb l'anticòs primari que faciliten l'entrada dels anticossos, disminueixen el marcatge inespecífic i disminueixen l'autofluorescència. Es tracta de la permeabilització amb detergents, en el nostre cas Tritó-X-100, i el blocatge de les unions inespecífiques tant a radicals aldehid, que se saturen amb NH_4Cl i glicina, com a llocs d'unió de proteïnes, que es bloquegen amb FBS. Així mateix, és recomanable fer la incubació de l'anticòs primari i secundari diluït amb la solució de blocatge diluïda. També cal fer un control del marcatge inespecífic, incubant una part de les mostres amb l'anticòs secundari directament.

SOLUCIONS

PBS-Glicina	20 mM (en PBS)
PBS-NH_4Cl	50 mM (en PBS)
PBS-Tritó-X-100	0,1% (en PBS)

FBS 10% 10% (en PBS)

Anticòs primari: **GLUT4**: anticòs policlonal OSCRX dirigit contra l'extrem C-terminal de la proteïna de rata. Obtingut en el nostre laboratori per la Dra. Conxi Mora (Gumà *et al.,* 1992). S'utilitza una dilució 1/100 del sèrum.

Anticòs secundari: Anticòs produït en cabra contra IgG de conill conjugat al fluorocrom Oregon Green (Goat Anti-Rabbit, Molecular Probes) s'utilitza a una dilució 1/100 en FBS 10%.

Ja que els compostos fluorescents són fotosensibles, cal protegir-LO de la llum.

PROCEDIMENT

1. Es posen els cobreobjectes on han crescut les cèl·lules i s'ha obtingut les làmines de membrana plasmàtica en una placa de 24 pous; i es fixen durant un mínim de 30 minuts amb paraformaldehid (PFA) al 3%
2. S'incuben els cobreobjectes amb PBS-NH_4Cl durant 10 minuts.
3. S'enretira la solució PBS-NH_4Cl i es posa PBS-Glicina durant 10 minuts.
4. S'incuba amb PBS-Tritó-X-100 durant 10 minuts.
5. Per tal d'evitar les unions inespecífiques de l'anticòs s'incuba amb FBS 10% durant 30 minuts.
6. Es retira la solució anterior i s'incuba amb l'anticòs primari durant 1 hora. Es posen 25 μl de l'anticòs sobre un parafilm i es posa el cobreobjectes cap per avall.
7. Es renta l'excés d'anticòs primari amb PBS. Es fan 3 rentat de 5 minuts.
8. S'incuba amb l'anticòs secundari.
9. Es renten els cobreobjectes fent 3 rentats amb PBS de 5 minuts.
10. Finalment, es munten els cobreobjectes amb *immunofluore mounting medium* de la casa ICN sobre un porta objectes i es conserven les preparacions protegides de la llum a 4ºC.
11. S'observen les preparacions amb un microscopi confocal (Serveis Cientificotècnics de la Universitat de Barcelona) utilitzant els filtres adequats.

Nota: a l'hora de fer els rentats generalment es fa posant els cobreobjectes en plaques de 24 pous. El pas 4 serveix per a permeabilitzar les cèl·lules, en el nostre cas, com que la immunolocalització s'ha realitzat en làmines de membrana plasmàtica, no es fa aquest pas.

8. ASSAIG PER TRANSFERÈNCIA *WESTERN BLOT*

La detecció de proteïnes mitjançant transferència *Western* és una tècnica molt utilitzada per detectar específicament proteïnes que han estat separades mitjançant una electroforesi i transferides a una membrana. El protocol emprat consta dels passos següents:

- Separació de les proteïnes segons la mida mitjançant una electroforesi desnaturalitzant en un gel d'acrilamida (SDS-PAGE, o *SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)*.
- Transferència de les proteïnes des del gel cap a una membrana sintètica.
- Immunodetecció específica de les proteïnes transferides a la membrana.

8.1. ELECTROFORESI EN SDS-PAGE

L'electroforesi en gels de poliacrilamida-bisacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE) és el sistema més utilitzat per separar proteïnes en funció de la seva mida (Laemmli, 1970). Consisteix en la desnaturalització de les proteïnes de la mostra amb el detergent SDS, que a la vegada confereix càrrega negativa al complex, i la separació de les proteïnes en una matriu de poliacrilamida, aplicant-hi un camp elèctric.

En aquest tipus d'electroforesi s'utilitzen dos tipus de gels de diferent concentració d'acrilamida: el gel concentrador i el gel separador. El primer, de concentració d'acrilamida més baixa (3,3%) i, per tant, de mida de porus més gran, té com a finalitat alinear totes les proteïnes de la mostra davant de l'inici del gel separador. El segon, de malla més espessa (7,5%, 10%, etc., en funció de la mida de les proteïnes que es vulgui separar), té com a funció separar les proteïnes segons la seva mida. S'ha utilitzat el sistema *Mini-Protean II* de BioRad.

SOLUCIONS

Tampó d'electroforesi x10:

Tris-Base	250 mM
Glicina	1,91 M
SDS	1%

Es guarda a temperatura ambient.

Solució d'acrilamida-bisacrilamida (30%-0,8%) (Pronadisa).

Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)

Tris-Base 1,5 M (pH 8,8)

Tampó de càrrega Laemmli x3 (LSBx3) per a 20 ml en aigua bidestil·lada:

Tris-HCl a pH 6,8, 0,3 M	4ml d'1,5 M
Glicerol 60%	12 ml de 87%
SDS 6%	1,2 g
Blau de bromofenol	1 mg

Es conserva a temperatura ambient.

Gel concentrador:

Acrilamida	3,3%
Bis-N,N'-metilen-bis-acrilamida	0,088%
Tris-HCl a pH 6,8	0,125 M
SDS	0,1%
Persulfat d'amoni (APS)	0,1%
TEMED (BioRad)	6,6 mM

S'utilitza una mescla estoc d'acrilamida 30% i bisacrilamida 0,8% comercial (Pronadisa).

Gel separador:

Acrilamida (segons el rang de resolució i el pes molecular de la proteïna)	7,5%, 10% o 12%
Bis-N,N'-metilen-bis-acrilamida	0,2%, 0,26% o 0,32%
Tris-HCl de pH 8,8	0,375 M
SDS	0,1%
Persulfat d'amoni (APS)	0,1%
TEMED	2,2 mM

El TEMED i el persulfat d'amoni s'han d'afegir en el darrer moment, ja que tots dos són catalitzadors del procés de polimerització.

Marcadors de pes molecular pretenyits (*Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range*, BioRad 161-0318).

Fumarasa pretenyida (Sigma) diluïda al 0,02% en LSBx1.

DTT 2 M en aigua destil·lada. Es conserva a -20ºC.

PROCEDIMENT

1. Es preparen les mostres que s'han de carregar en un tub Eppendorf. Normalment es carreguen entre 5 i 100 μg de proteïna en tampó de càrrega LSBx1. En cas que es vulguin fer córrer les mostres en condicions reductores per trencar ponts disulfur, s'hi afegeix DTT a una concentració final de 100 mM. Un cop preparada la mostra, s'escalfa a 95ºC durant 5 minuts i se centrifuga a màxima velocitat durant 6 segons.
2. Es polimeritzen els gels entre els vidres del sistema. Primerament es prepara el gel separador, s'aboca entre els vidres per a què polimeritzi i s'hi afegeix una fina capa d'aigua destil·lada per evitar que l'oxigen de l'aire inhibeixi la polimerització. Un cop polimeritzat, se'n treu l'aigua i s'asseca amb paper de filtre la superfície de damunt del gel, es prepara el gel concentrador i s'aboca sobre el separador sempre amb cura de no fer bombolles, ràpidament es col·loca la pinta per formar els pous de càrrega.
3. Un cop polimeritzat el gel concentrador, es treu la pinta, es col·loca el gel al seu suport a la cubeta plena de tampó d'electroforesi i es carreguen les mostres de proteïna en els pous corresponents. També es carreguen en un pou 10 μl de marcadors de pes molecular pretenyits. La càrrega de les mostres es realitza mitjançant la utilització d'una pipeta Hamilton.
4. Es tanca el circuit elèctric i es fa córrer l'electroforesi aproximadament durant una hora a 150 V. S'atura l'electroforesi quan el front de colorant arriba al final del gel, o bé es deixen escapar alguns marcadors de pes molecular per afavorir la separació de proteïnes d'alt pes molecular.
5. Finalment, es desmunta el sistema i se separa el gel dels vidres. A continuació es transfereixen les proteïnes (vegeu l'apartat següent) o, alternativament, es pot utilitzar el gel per fer una tinció Coomassie per visualitzar les proteïnes.

Electroforesi amb tampó tricina:

Serveix per detectar proteïnes de pes molecular petit i s'ha usat en el cas de la detecció de les proteïnes marcadores de la fracció endocrina (IAPP, *isled amyloid polypeptide*) i exocrina (α-amilasa) del pàncrees.

Es fa l'electroforesi durant tota la nit a 4ºC i amb amperatge constant a 40 mA. S'usa un gel de percentatge d'acrilamida elevat (20%) i el tampó d'electroforesi és tampó tricina. Per millorar la transferència de les proteïnes s'usa un tampó de transferència que conté 25% de metanol enlloc de l'habitual 20%. El marcador de pesos moleculars usat en aquest cas és Kaleidoscope *Polypeptide Srandards* (BioRad núm. 161-0325)

Tampó tricina 10 x, 250 ml en aigua, es conserva a temperatura ambient:

Tris base	1M	30,25 g
Tricina	1M	44,75 g
SDS	20%	12,5 ml

8.2. ELECTROTRANSFERÈNCIA

Un cop les proteïnes estan separades atenent la mida en un gel d'acrilamida, aquestes són transferides a una membrana sintètica, on quedaran fixades en la mateixa posició en què es trobaven en el gel, de manera que es pot detectar específicament una banda corresponent a una proteïna separada de les altres bandes pel seu pes molecular.

En el nostre cas la transferència electroforètica de les proteïnes s'ha dut a terme en una membrana de tipus immobilon (*Immobilon-P Transfer Membrane*, Millipore) i utilitzant el sistema de transferència *Mini-Protean TransBlot Cell* de BioRad.

MATERIALS

- Membrana de *PVDF (Polyvinylidene) Inmobilon-P* de Millipore tallada a la mateixa mida que el gel separador.
- Paper de *blot* de 3 mm, tallat a una mida lleugerament més gran que el gel separador (*gel blotting paper* Schleicher-Schuell).

SOLUCIONS

Tampó de transferència (pH 8,3):

Tris-base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20%

Tenyidor de gels (Coomassie Blue):

Àcid acètic	7,5%
Isopropanol	25%
Brilliant blue	0,05%

Destenyidor de gels:

Àcid acètic	7,5%
Isopropanol	7,5%

PROCEDIMENT

1. Una vegada acabada l'electroforesi el gel de separador se separa del gel concentrador i se submergeix en tampó de transferència.
2. Es prepara la membrana activant-la en metanol durant 2 minuts i hidratant-la amb aigua destil·lada durant 2 minuts més. És molt important que la membrana, una vegada mullada, no torni mai a assecar-se.
3. Es procedeix a muntar el casset en una safata plena de tampó de transferència. Sobre la part negra del casset s'hi col·loca una esponja, un paper de *blot* i el gel separador, i a sobre d'aquest s'hi col·loca la membrana, un altre paper de *blot* i una altra esponja. És molt important que no quedin bombolles entre el gel i la membrana perquè en cas contrari les proteïnes no es transferiran a la membrana. Finalment, es tanca el casset sense que es moguin els elements que hi ha al seu interior.
4. Es col·loca el casset dins el sistema de transferència, en l'orientació correcta perquè les proteïnes migrin del gel cap a la membrana en desplaçar-se cap al pol positiu, i tot el conjunt dins la cubeta de transferència. Es posa un bloc de gel per evitar l'escalfament excessiu del conjunt i s'omple la cubeta amb tampó de transferència.
5. S'hi aplica un corrent de 250 mA durant una hora i mitja, i en finalitzar es desmunta el sistema sense que la membrana s'assequi, ja que això dificultaria la detecció de les proteïnes. Les bandes del marcador de pes molecular presents ara en la membrana i absents en el gel són un indicador de que la transferència ha funcionat correctament.
6. El gel es tenyeix submergint-lo en *Coomassie Blue* al llarg d'una hora a temperatura ambient, es destenyeix amb la solució destenyidora de gels durant total la nit i s'asseca mitjançant un assecador de gels de la casa BioRad. La visualització de les proteïnes que romanen en el gel després de la transferència serveix per comprovar l'eficiència de la transferència.

8.3. ASSAIG D'IMMUNOTRANSFERÈNCIA O IMMUNODETECCIÓ

Aquest procés permet detectar la banda corresponent a la proteïna d'interès en una membrana on ha estat prèviament transferida. Consta bàsicament de quatre fases: a) blocatge de la membrana, b) incubació amb l'anticòs primari específic contra la proteïna d'interès, c) incubació amb l'anticòs secundari adequat conjugat amb peroxidasa de rave, d) detecció d'aquesta activitat enzimàtica en la membrana utilitzant el sistema quimioluminiscent d'ECL (*Enhanced Chemioluminiscence*) d'Amersham.

El bloqueig de la membrana consisteix a incubar-la amb una solució rica en proteïnes (normalment llet descremada, però també es pot utilitzar una solució d'albúmina o de gelatina de peix) a fi d'evitar al màxim la unió inespecífica de l'anticòs primari.

MATERIALS

- Casset d'exposició, films fotogràfics i solucions de revelat.
- Els anticossos usats amb les corresponents solucions de bloqueig i rentat es troben detallats a l'apèndix II.
- Reactiu ECL (Amersham): aquest reactiu permet detectar els anticossos conjugats a peroxidasa de rave basant-se en el fet que aquest enzim catalitza una reacció química que produeix un producte luminiscent. Es prepara just abans que s'hagi d'utilitzar i es pot guardar a 4°C, protegit de la llum barrejant volums iguals de reactiu 1 i reactiu 2.

PROCEDIMENT

1. Es bloqueja la membrana en solució de bloqueig durant 1 hora a 37ºC en un bany amb agitació.
2. Se segella la membrana dins una bossa de plàstic amb 5 ml de solució d'anticòs primari. S'incuba amb agitació orbital a 4ºC tota la nit.
3. Un cop finalitzada la incubació amb l'anticòs primari, es fan 3 rentats de la membrana durant 10 minuts a 37ºC amb agitació amb 100 ml de tampó de rentat.
4. S'incuba la membrana amb la solució d'anticòs secundari, durant 1 hora a temperatura ambient amb agitació.
5. Es fan 3 rentats de 10 minuts amb tampó de rentat, a 37ºC.
6. S'esbandeix breument la membrana en PBS i s'incuba durant 1 minut amb el reactiu ECL.
7. Es col·loca la membrana en un casset protegida per una bossa de plàstic, i es fan diverses exposicions amb un film fotogràfic a temperatura ambient.

8.4. REUTILITZACIÓ DE MEMBRANES D'IMMOBILON EN ASSAJOS DE TRANSFERÈNCIA *WESTERN BLOT*: *STRIPPING* DE MEMBRANES

Una vegada finalitzat l'assaig de transferència *Western blot* les membranes d'Immobilon poden reutilitzar-se per a l'estudi d'altres proteïnes.

Quan volem estudiar proteïnes que tenen pesos moleculars molt diferents es renta la membrana tres cops (a temperatura ambient durant 10 minuts) amb solució de rentat i es pot incubar directament la membrana amb l'anticòs que reconeix la proteïna que ens interessa. Alternativament abans de fer la primera immunolocalització es pot tallar la membrana, incubar-la en paral·lel amb els dos anticossos i realitzar paral·lelament la resta del protocol.

D'altra banda, quan les proteïnes que volem estudiar tenen pesos moleculars semblants, el senyal dels anticossos primari i secundari que s'ha utilitzat per detectar la primera

proteïna pot interferir en el senyal dels següents anticossos que es fan servir. Per aquesta raó, caleliminar de la membrana els anticossos que estan units i deixar-hi únicament les proteïnes que van quedar fixades a la membrana durant l'electrotransferència. Per eliminar els anticossos s'utilitza la tècnica de *stripping* de membranes. Aquesta tècnica funciona bé quan els anticossos primaris usats han estat produïts en espècies diferents, ja que sovint només es perd l'anticòs secundari, el primari pot quedar enganxat algunes vegades. Així si els anticossos secundaris usats en la primera i la segona immunodetecció són diferents no hi haurà problemes, però en cas que siguin r produïts en la mateixa espècie i que s'hagin detectat proteïnes amb pesos moleculars molt semblants, la reutilització pot ser inviable.

SOLUCIONS

Tampó d'*stripping* en PBS

Tris-HCl	62,5 mM (pH 6,8)
β-mercaptoetanol	100 mM
SDS	2%

Tampó de rentat en PBS

Tween-20	0,2%

PROCEDIMENT

1. Es rehidrata la membrana en PBS i s'incuba amb 100 ml de tampó de *stripping* durant 30 minuts a 50ºC amb agitació constant.
2. Es fan dos rentats de 10 minuts a temperatura ambient amb un gran volum de solució de rentat per eliminar-ne les restes de tampó de *stripping*.
3. Es fa un rentat amb PBS.
4. Es bloqueja de nou la membrana durant 1 hora a 37ºC.
5. Després del bloqueig ja es pot incubar la membrana amb l'anticòs primari desitjat seguint les instruccions de l'apartat anterior.

Nota: cada cop que es reutilitza una membrana la imatge final que s'obté amb l'assaig de transferència *Western blot* perd qualitat, per això es recomana no utilitzar aquest mètode més de dues vegades amb una mateixa membrana.

9. PREPARACIÓ I MANIPULACIÓ DE DNA I RNA

En aquesta tesi, el treball amb tècniques de biologia molecular no ha estat un dels elements centrals. Els protocols que es detallen a continuació s'han realitzat amb l'objectiu de determinar possibles canvis en el nivell d'adipocitocines expressades en el teixit adipós d'animals que havien estat sotmesos a tractaments crònics amb benzilamina i vanadat.

Aquesta hipòtesi es basa en la implicació de les adipocitocines en processos de resistència a la insulina i el fet que el tractament amb benzilamina i vanadat afecta directament al teixit adipós i millora la resistència a la insulina.

L'anàlisi de l'expressió de les adipocitocines es va fer usant la tècnica de PCR en temps real i per això es van seguir els passos següents:

- aïllament d'RNA de teixit adipós
- comprovació de la qualitat de l'RNA en gel d'agarosa/formaldehid
- síntesi de cDNA per reacció de retrotranscripció, RT
- comprovació dels encebadors o *primers* i de la RT per PCR
- anàlisi dels productes de PCR en gel d'agarosa
- seqüenciació dels productes de PCR
- PCR en temps real (i PCR semiquantitativa en una primera aproximació)

Per obtenir i manipular RNA cal prendre diverses precaucions. La manipulació de les mostres ha d'estar dirigida a la prevenció de contaminacions per RNAses que puguin provenir del medi ambient o de les mans del manipulador, ja que són ubiqües; és obligatori usar guants i de solucions lliures d'RNAses. Totes les solucions s'han preparat amb aigua tractada amb DEPC, s'han d'utilitzar reactius d'ús específic lliures d'RNAses (sempre manipulats amb guants i sense introduir-hi espàtules) i material de vidre sotmès a esterilització a 200ºC durant, almenys, 4 hores. El material de plàstic esterilitzat ha d'estar reservat per a aquest ús exclusiu.

9.1. AÏLLAMENT D'RNA TOTAL: AÏLLAMENT PER CsCl

Per a l'aïllament d'RNA total a partir de teixit adipós s'ha fet servir el mètode d'ultracentrifugació en CsCl. Aquest mètode està descrit com el millor per a l'extracció d'RNA. Separa perfectament l'RNA de la fracció de proteïnes i del DNA, la qual cosa està indicada per fer la posterior síntesi de cDNA, alhora que presenta el major percentatge de recuperació d'RNA, cosa molt important en el cas de treballar amb teixit adipós.

MATERIAL

- Ultracentrífuga i rotor basculant.

SOLUCIONS

Solució de GTC (pH 5,5) per a 100 ml en H_2O:

47,26 g de tiocianat de guanidina (4 M final)

0,6 ml d'acetat de sodi 3M

Filtració amb un paper Wathmann.

Solució de CsCl 5,7 M, per a 50 ml en H_2O:

48 g CsCl

0,165 g EDTA

50 μl DEPC

Cal agitar durant 30 minuts i autoclavar.

Sarcosil 10%

β-mercaptoetanol 14 M

Aigua DEPC: S'ha d'agitar 1 l d'aigua estèril amb 1 ml de Diethilpyrocarbonate durant 30 minuts i autoclavar.

PROCEDIMENT

1. En un Falcon de 50 ml s'afegeixen 3,2 ml de solució de Guanidina (GTC) sense sarcosil ni DTT i 25 μl β-mercaptoetanol.
2. S'afegeix el teixit al Falcon (100-200 mg en el cas del teixit adipós) abans que aquest es descongeli i s'homogeneïtza amb el politró amb la sonda d'1 cm de diàmetre a una velocitat de 6-7 durant 15 segons.
3. S'hi afegeix 1 g de CsCl i després que es dissolgui s'hi afegeixen 150 μl de sarcosil al 10%.
4. S'afegeixen 1,5 ml de solució de CsCl en tubs Sorvall d'ultracentrífuga.
5. Es posa, amb molt de compte, la mostra sobre el CsCl, amb una pipeta Pasteur autoclavada. Es formen dues fases ben diferenciades.
6. Es posen els tubs a les seves camises i s'equilibren amb solució de guanidina.
7. S'ultracentrifuguen els tubs a 40.000 rpm (centrífuga Beckman) durant 16 h a 20ºC, amb acceleració 5 i desacceleració 1.
8. Es formen diverses fases (figura 4). Cal descartar tots els sobrenedants amb una pipeta Pasteur autoclavada, amb molta cura de no tocar el fons. Els últims μl s'extreuen amb el tub cap per avall i es deixar el tub cap per avall fins que s'assequi.
9. Segons la mida del precipitat s'hi afegeixen entre 20-40 μl d' H_2O DEPC en el punt

16.

10. S'hi afegeixen 300 μl d'aigua DEPC i es deixa 10 minuts perquè es redissolgui l'RNA.
11. Es recullen els 300 μl d'RNA i es passen a un tub Eppendorf. Es renta el tub amb 50 μl més d'aigua DEPC per recollir tot l'RNA.
12. S'hi afegeixen 900 μl d'etanol absolut i 35 μl d'acetat de sodi 3 M, es mescla per inversió i es deixa la solució 1 hora a -80ºC.
13. Per precipitar l'RNA, se centrifuga durant 30 minuts a 4ºC amb una centrifugadora de sobretaula a velocitat màxima (14.000 rpm).
14. Es renta el precipitat d'RNA amb 200 μl d'EtOH al 70% i es torna a centrifugar durant 15 minuts.
15. S'elimina l'etanol aspirant amb una pipeta Pasteur connectada a una bomba de buit i es deixa assecar a l'aire.

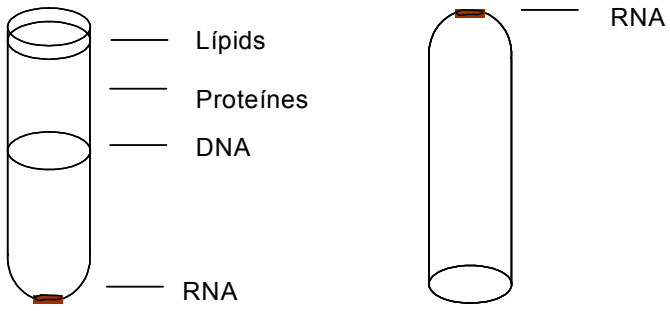


Figura 5. Fases formades després de la ultracentrifugació.

16. Es redissol el precipitat sec en H_2O DEPC segons el precipitat obtingut al punt 9, deixant que es rehidrati durant 10 minuts. Es resuspèn bé i es guarda a -80ºC.
17. Es quantifica l'RNA obtingut espectrofotomètricament i es comprova la seva integritat càrregant una alíquota de 0,5 μg en un gel d'agarosa desnaturalitzant.

Nota: per a la quantificació s'utilitza un espectrofotòmetre Shimadzu amb el qual es determina l'espectre d'absorció entre 320 i 220 nm. Així es pot obtenir la concentració d'RNA (en aplicar la relació 1 DO_{260}nm = 40 μg RNA/ml) i també la puresa de la preparació (la relació DO_{260}/DO_{280} ha de ser 1,8-2, i l'absorbància mínima ha d'estar a 230 nm després d'haver observat un màxim d'absorció a 260 nm). Per a la quantificació, cal diluir l'RNA 1/200.

9.2. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA/FORMALDEHID

El gel d'agarosa-formaldehid és un sistema d'electroforesi desnaturalitzant simple que permet una bona resolució de l'RNA de cadena senzilla (Lehrach *et al.*, 1977). En el nostre cas s'ha incorporat menys formaldehid que en el protocol original tal com han descrit Davies i col·laboradors (Davies *et al.*, 1986).

S'ha utilitzat aquest tipus de gel per analitzar l'RNA aïllat. La desnaturalització de l'RNA garanteix que la mobilitat electroforètica sigui funció del pes molecular. Per tal de visualitzar l'RNA s'ha incorporat bromur d'etidi directament a la mostra (Rosen *et al.*, 1990).

SOLUCIONS

MOPS 400 mM, pH 7,0
Acetat sòdic 100 mM
EDTA 10 mM
Tampó de càrrega d'RNAx2 (*Gel loading Buffer II*, Ambion núm.8546G)
Bromur d'etidi 400 μg/ml

Gel d'agarosa/formaldehid en tampó d'electroforesi x1 (apèndix I):

Agarosa	1%
Formaldehid	0,66 M

Es prepara el dia que s'hagi d'utilitzar.

Nota: els gels d'agarosa l'1% (p/v) estan indicats perquè tenen una bona resolució de fragments compresos entre 0,4-6 kb (Sambrook *et al.*, 1989).

PROCEDIMENT

Preparació de les mostres:

1. En un tub Eppendorf es posen 5 μg d'RNA.
2. S'afegeix tampó de mostra desnaturalitzant x2 (apèndix I) i 1μl de bromur d'etidi (400 μg/ml).
3. Es desnaturalitza la mostra escalfant-la a 65ºC durant 5 minuts i es deixa refredar en gel fins al moment de càrregar les mostres.

Preparació del gel i electroforesi:

1. Es fonen 0,5 g d'agarosa en 40 ml d'aigua DEPC en el microones.
2. Es deixa temperar i, sota una campana extractora de fums, s'afegeixen 5 ml de tampó d'electroforesi x10 i 8 ml de formaldehid al 37%.
3. S'aboca la solució al motlle per fer gels on s'hi haurà col·locat la pinta. Es deixa solidificar el gel.
4. S'enretira la pinta, es col·loca el gel (amb el seu motlle) a la cubeta d'electroforesi i es cobreix amb tampó d'electroforesi.

5. Es càrrega la mostra als pous incloent-hi un carril amb marcadors de pes molecular (0,5 μg d'RNA Ladder, Life Technologies-BRL) i es fa córrer a 40 V (voltatge constant) durant 3-4 hores. L'electroforesi es fa sota campana extractora.

9.3. SíNTESI DE cDNA: RT-PCR

REACTIUS

Oligo $(dT)_{12-18}$ (100 μM)
Mix de dNTP (10 mM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP a pH neutre)
RNAseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl) (Life Technologies)
Transcriptasa reversa *Super Script II* (200 U/μl) (Life Technologies)

Tampó de primera cadena x 5 (*Frist-Strand Buffer*) (Life Technologies):
250 mM Tris-Hcl, pH 8,3
375 mM KCl
15 mM $MgCl_2$

PROCEDIMENT

1. Es mesclen 2 μg d'RNA, 1μl d'Oligo $(dT)_{12-18}$, 1 μl de mix de dNTP i s'hi afegeix H_2O fins a 12 μl.
2. S'escalfa a 65ºC durant 5 minuts i es refreda ràpidament en gel.
3. Es fa un spin per a recuperar tot el volum i s'hi afegeixen 4 μl de tampó de primera cadena x 5, 2 μl de DTT 0,1 M i 1 μl d'RNAseOUT.
4. S'incuba a 42ºC durant 2 minuts.
5. S'hi afegeix 1 μl de *Super Script II* i es mescla per pipeteig.
6. S'escalfa durant 50 minuts a 42ºC i seguidament s'inactiva la reacció escalfant a 70ºC durant 15 minuts.

Nota: la reacció d'RT no es comprova directament, sinó que cal fer una PCR posterior. S'afegeixen però uns tubs control:

- Control positiu de l'RT. Utilitzant un RNA prèviament testat.
- Control negatiu, on no es posa RNA.
- Control de contaminació per genòmic on es posa la mostra i tota la resta excepte l'enzim; així no es pot obtenir DNA i, llevat que ja n'hi hagi que contaminés, la PCR posterior no amplificarà res. Per evitar problemes amb possibles contaminacions va bé dissenyar els *primers* de la PCR de manera que estiguin a exons diferents, així no es podrà amplificar el DNA genòmic que contindrà introns i donaria fragments massa grans.

9.4. PCR

S'ha utilitzat la tècnica de PCR amb la finalitat de comprovar la reacció de síntesi de cDNA, de controlar la possible contaminació per DNA genòmic i per testar els encebadors o *primers* dissenyats; en aquest darrer cas s'utilitza un DNA ja testat.

REACTIUS

Encebador 3´i 5´a 10 μM
Mix de dNTP (10 mM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP a pH neutre)
Taq DNA polimerasa 5 U/μl (Promega)

Tampó de reacció x10 (Promega):

500 mM KCl
100 mM Tris HCl, pH 9
15 mM MgCl2
1% Tritó-X-100

Preparació de les mostres:

Per a cada mostra cal afegir el conjunt de reactius següent i 1 μl de cDNA, el que es fa és realitzar una *mix* comuna per a totes les mostres i després repartir-la en tubs on s'afegeix el cDNA que hem de testar. Es realitza també un control on es posa H_2O enlloc de DNA per descartar possibles contaminacions d'algun dels reactius.

Taula 1. Components i volums dels reactius de la PCR.

Component	Volum per reacció (ml)
Aigua estèril	18,75
tampó de reacció x10	2,5
dNTP mix (10mM)	0,5
Primer 3´ (10 μM)	1,0
Primer 5´(10 mM)	1,0
Taq DNA polimerasa	0,25
Final	24,0

Condicions del termociclador:

- 1 cicle a 94ºC durant 3 minuts
- 35 cicles de:
  - 94ºC durant 30 segons
  - 60ºC durant 30 segons
  - 72ºC durant 1 minut
- 1 cicle a 72ºC durant 4 minuts
- a 4ºC fins a treure els tubs del termociclador

9.5. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

L'electroforesi en gel d'agarosa és un mètode estàndard per separar fragments de DNA. La mobilitat dels fragments de DNA és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. El factor més important en la separació és la mida del porus del gel, és a dir, la concentració d'agarosa. Rutinàriament s'ha utilitzat una concentració de l'1% (p/v) d'agarosa que dóna una bona resolució de separació de fragments d'entre 0,4 i 6 kb. Per resoldre fragments més petits cal fer servir concentracions d'agarosa de fins al 3%.

SOLUCIONS

Solució de bromur d'etidi:

Bromur d'etidi a 400 μg/ml en aigua bidestilada.

Gel d'agarosa en tampó TAEx1 (apèndix I):

1% agarosa

Bromur d'etidi, 40 ng/ml de gel

TAEx1

Generalment s'ha preparat just abans d'utilitzar-lo encara que es pot conservar a 4ºC embolicat amb paper de plàstic per evitar-ne la dessecació.

Marcador de pes molecular: 1 kb DNA ladder, Gibco-BRL

PROCEDIMENT

Es preparen gels de 50 ml, volum òptim dels sistemes d'electroforesi utilitzats (*Mini-Sub Cell GT* de BioRad).

Preparació del gel:

1. Es pesen 0,5 g d'agarosa i s'afegeixen 50 ml de TAEx1 en un erlenmeyer de 150-200 ml (gel l'1% d'agarosa).
2. Es fa fondre l'agarosa en un microones i es deixa refredar a temperatura ambient.
3. Es prepara el suport tancant els extrems amb cinta de pintor i col·locant la pinta (motlle per als pous).
4. Quan l'erlenmeyer es pot agafar sense que cremi (aproximadament a 40ºC) s'hi afegeix el bromur d'etidi (5 μl de l'estoc a 400 μl/ml per un gel de 50 ml). Es barreja bé i es llença dins del suport tancat amb cinta de pintor i amb la pinta preparada.
5. Quan el gel s'ha solidificat es treu la pinta i la cinta de pintor que segella els extrems del gel i es col·loca a la cubeta d'electroforesi.
6. S'hi afegeix tampó TAEx1 de manera que aquest cobreixi el gel.

Preparació de les mostres:

1. En un tub Eppendorf de 1,5 ml s'afegeix la mostra de DNA i el volum corresponent de tampó de càrrega 5x (concentració final x1). Es carreguen volums finals entre 10-20 μl dependent del volum del pou del gel. La mostra es pot diluir amb aigua bidestil·lada en cas que estigui massa concentrada. Es prepara paral·lelament un tub amb el marcador de pes molecular.
2. Es càrrega cada mostra en un pou del gel, es connecten els elèctrodes a la font d'electroforesi i es fa córrer el gel a un voltatge constant de 60-80 V. El DNA, amb càrrega negativa, migra cap al pol positiu.
3. El resultat de l'electroforesi es comprova en un transil·luminador de raigs UV. Hem disposat d'un sistema d'obtenció d'imatges (*gel-station*) per obtenir fotografies dels gels.

9.6. SEQÜENCIACIÓ DEL PRODUCTE DE PCR

Per fer la comprovació definitiva d'una seqüència de nucleòtids, cal emprar un sistema de seqüenciació. Amb aquesta finalitat s'ha utilitzat el kit ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. Aquest consisteix en una reacció de PCR en amplificació aritmètica on s'inclouen dideoxinucleòtids fluorescents que aturen la polimerització i permeten la seva identificació.

REACTIUS

- Barreja de nucleòtids amb terminadors fluorescents i AmpliTaq DNA polimerasa amb $MgCl_2$ i tampó Tris-HCl pH 9 (subministrats amb el kit). Es conserva a -20ºC.
- Oligonucleòtid encebador 3,2 pmol/μl
- Aigua estèril
- DNA per seqüenciar 0,1-0,2 μg/μl
- Etanol absolut
- Etanol al 70%
- Acetat sòdic 3 M

PROCEDIMENT

1. Es prepara la barreja de reacció seguint les indicacions del proveïdor:
   - Barreja de terminadors 4,0 μl
   - DNA motlle 1-2,5 μl (uns 300 ng)
   - oligonucleòtid encebador 1μl (3,2 pmols)
   - H_2O fins a 10 μl
2. Es duu a terme la reacció de seqüenciació programant prèviament el termociclador en les condicions indicades pel fabricant:
   - S'escalfa a 96ºC per desnaturalitzar els DNA durant 30 segons
   - Es realitza la hibridació motlle-encebador a 50ºC durant 5 segons
   - Es fa la reacció de polimeritació a 60ºC durant 4 minuts
   - Es repeteix el procés durant 25-30 cicles
   - Es deixa refredar a 4ºC
3. Es precipita afegint a cada tub de reacció 2 μl d'acetat sòdic i 50 μl d'etanol absolut i centrifugant-ho a 13.000 rpm durant 15 minuts.
4. Se n'extreu el sobrenedant i es renta el precipitat amb 250 μl d'etanol al 70%. S'aspira l'etanol i es deixa assecar a temperatura ambient.

Les reaccions de seqüenciació han estat analitzades pels serveis Cientificotècnics de la Universitat de Barcelona.

9.7. PCR EN TEMPS REAL

El mètode utilitzat està basat en el sistema *GeneAmp 5700 Sequence Detection System* d'Applied Biosystems (Courtaboeuf, França) i permet detectar la quantitat de producte format en cada cicle d'amplificació de PCR degut al fluorocrom *SYBR green* que emet quan es posa en contacte amb DNA de doble cadena; així, a mesura que es van formant còpies de DNA en cada cicle de PCR augmenta la fluorescència emesa.

El que es fa és mirar quants cicles (C_T) necessita cada mostra per emetre una fluorescència determinada i preestablerta, que anomenen llindar o *threshold* (ΔRn). Aquests C_T són inversament proporcionals a la quantitat d'RNA inicial, així doncs, un C_T inferior indica una major quantitat d'RNA en la mostra inicial.

ΔRn es defineix com la diferència respecte de la fluorescència basal, el valor escollit és de 0,1, que és el primer punt on hi ha diferències significatives en la fluorescència emesa.

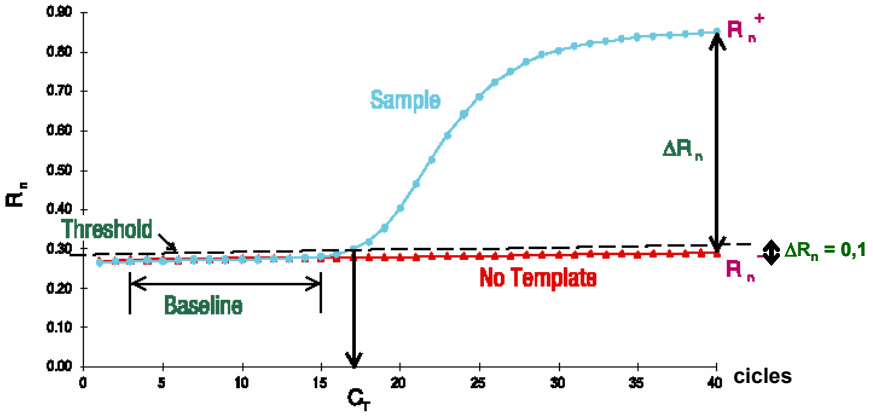


Figura 6. Corba d'amplificació.

El mètode consisteix en tres passos, els dos primers es poden considerar passos previs per a la posada a punt de la tècnica per l'RNAm específic que cal estudiar, el tercer és la seva mesura a les mostres problema.

Al final de la seqüència de cicles de cada amplificació es realitza una corba de dissociació a fi de comprovar que el producte amplificat és únic. En augmentar la temperatura a la qual està sotmesa la mostra, el DNA de doble cadena (dsDNA) que s'ha format es va separant. Com que el SYBR green només emet fluorescència quan està entre una doble cadena de DNA aquesta va disminuint en l'anar augmentant la temperatura. La corba de fluorescència obtinguda és del tipus següent:

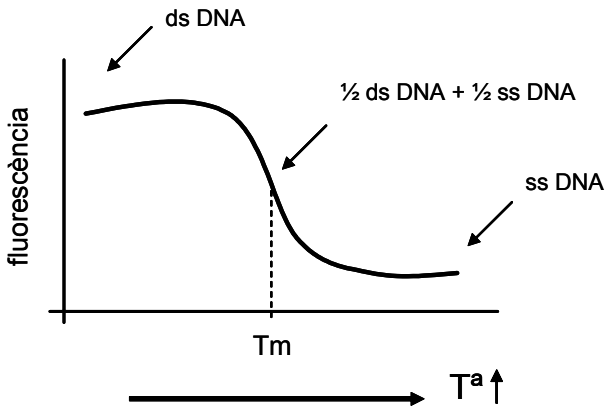


Figura 7. Corba de dissociació.

Si es fa la derivada s'obté un pic que coincideix amb el punt on la meitat de les cadenes de DNA estan dissociades (DNA de cadena senzilla, ssDNA) i la meitat encara unides (ds DNA), aquesta temperatura s'anomena Tm i és característica de cada seqüencia de DNA. D'aquesta manera si només s'obté un pic vol dir que només s'ha format un producte de PCR, que és el que desitgem.

D'altra banda, si els *primers* usats formen dímers, com que es tracta de dobles cadenes de DNA també s'emet fluorescència i també formaran un pic, en aquest cas també cal millorar les condicions de treball ja que les dades que s'obtindran no seran quantitatives.

REACTIUS

SYBR green PCR Master Mix 2x

- SYBR green dye
- AmpliTaq Gold DNA polymerase
- dNTPs (dUTP, dATP, dCTP, dGTP)
- Referència passiva
- UNG AmpErase (uracil-N-glicosidasa)

Taq MAn Universal PCR Master Mix

- AmpliTaq Gold DNA polymerase
- dNTPs (dUTP, dATP, dCTP, dGTP)
- Referència passiva
- Components del tampó optimitzats

La referència passiva és una molècula que també emet fluorescència. Durant l'amplificació

va augmentant la fluorescència deguda al SYBR green però la fluorescència emesa per la referència passiva es manté constant; això ens permet detectar errors de pipeteig del reactiu.

Determinació de la concentració dels encebadors:

Es tracta de determinar la concentració d'encebadors que donen una C_T més baixa corresponent a un threshold (ΔRn) de 0,1 però sense que es produeixi la formació de dímers d'encebadors.

PROCEDIMENT

1. Es dilueixen els encebadors per tenir una concentració final de la barreja d'encebador *sense* i *antisense* de 900, 300 i 50 nM.
2. Es dilueix el cDNA per tenir una solució que contingui 10 ng de cDNA en 5 μl d'aigua ultrapura. La concentració de cDNA es calcula com a equivalents d'RNA tenint en compte la quantitat d'RNA que es va utilitzar a la reacció de retrotranscripció.
3. Es mesclen a cada pou d'una placa Microtiter de 96 pous, 13 μl de la solució de SYBR, els 5 μl de la solució de cDNA i 8 μl dels encebadors (el volum total de reacció és de 26 μl).
4. Condicions usades al termociclador:
   - 1 cicle de 2 minuts a 50ºC
   - 1 cicle de 10 minuts a 95ºC
   - 40 cicles de:
     - 15 segons a 95ºC
     - 1 minut a 60ºC
5. Un cop acabada l'amplificació es realitza una corba de dissociació per a detectar la possible presència de dímers d'encebador o de diversos productes de PCR.

Nota: durant els 2 minuts a 50ºC inicials s'activa la UNG present al kit SYBR green; aquesta elimina de la mescla de reacció cadenes de DNA que porten dUTP, de manera que s'eviten possibles contaminacions amb fragments amplificats en PCR anteriors.

El cicle a 95ºC inicial serveix per activar la polimerasa del kit (AmpliTaq Gold polimerasa), és un *hot star* de la reacció. Aquesta polimerasa es troba inhibida en la seva forma inicial de manera que permet fer tota la preparació de les plaques de PCR a temperatura ambient, quan es troba a 95ºC s'activa i es comença l'amplificació.

Validació de la linealitat de la PCR:

Aquest apartat de validació consisteix a comprovar, amb la concentració d'encebadors escollida, que la diferència d'amplificació entre les diferents quantitats de cDNA és constant i, per tant, la relació de C_T és lineal.

PROCEDIMENT

1. Es fan dilucions de cDNA per tenir quantitats de 20, 10, 5, 2 i 1 ng d'equivalents d'RNA en 5 μl d'aigua ultrapura.
2. Es realitza l'amplificació amb aquestes dilucions i afegint-hi els 8 μl de barreja d'encebadors establerta a l'apartat 1 i 13 μl de la solució SYBR.
3. Un cop acabada la reacció de PCR cal representar els resultats com a C_T enfront del logaritme de la concentració de cDNA. Un pendent de -3,33 indica 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.

Mesura de les mostres:

S'utilitzen 10 ng de cDNA (equivalents d'RNA) com a motlle per a la PCR en temps real en duplicat per a cada mostra i es calcula la C_T que dóna un *threshold* de 0,1 per a cada mostra. Al final dels cicles de PCR es realitza una corba de dissociació per verificar que s'ha amplificat un únic fragment.

S'utilitza l'RNA ribosòmic 18S com a control per normalitzar l'expressió gènica, la quantitat de 18S per a cada mostra d'RNA es quantifica usant el kit *Ribosomal RNA Control TaqMan Assay* d'Applied Biosystems. Aquest kit té un funcionament lleugerament diferent del SYBR green. A més dels encebadors específics per al gen conté una sonda específica d'aquest marcada amb un fluorocrom. La sonda s'uneix a 70ºC i els encebadors quan la temperatura baixa a 60ºC, en aquest moment s'inicia l'elongació i quan s'arriba a la sonda aquesta es degrada i s'allibera el fluorocrom que tenia unit de manera que emet. Es tracta d'un mètode més específic ja que només s'emet fluorescència quan tant els encebadors com la sonda s'uneixen a la seqüència adequada, si els encebadors s'uneixen a una altra zona com que la sonda no estarà al mig, encara que es creï un altre producte de PCR aquest no emetrà. En aquest cas no té sentit realitzar una corba de dissociació ja que el fluorocrom que emet es troba lliure, en cada còpia produïda s'ha alliberat una molècula de fluorocrom.

Un altre control fet és utilitzar les mostres control negatiu de l'RT, on no s'havia posat

l'enzim per sintetitzar el cDNA de manera que si en aquestes hi ha amplificacions això indica que l'RNA aïllat estava contaminat de DNA genòmic. Així mateix, s'introdueix un control negatiu de la PCR on es posa H_2O enlloc de la mostra de cDNA per comprovar que no hi ha contaminació per DNA de cap dels reactius.

PROCEDIMENT

1. Es posen a cada pou els 5 μl de cada mostra, per duplicat, que contenen els 10 ng d'equivalents d'RNA, a cada pou.
2. S'afegeixen els 8 μl de la barreja d'encebadors a la concentració establerta a l'apartat 1.
3. S'hi afegeixen els 13 μl de la solució SYBR.
4. Es fa l'amplificació i la corba de dissociació amb les mateixes condicions descrites a l'apartat 1.

Nota: en els pous on es mesura el 18S només s'afegeix la mostra i la solució comercial del kit *TaqMan*, els encebadors ja estan incLOos en la solució del kit.

CÀLCULS

Per calcular la quantitat relativa d'RNA present a cada mostra respecte de la quantitat de 18S es realitza el càlcul següent:

$$\textbf{Quantitat relativa} = 2^{(C_T \text{ 18S} - C_T \text{ mostra})}$$

ENCEBADORS USATS

Els encebadors es van dissenyar usant el software *Primer Express 1.5 d'Applied Biosystems*. Es van escollir *amplicons* entre 65 i 90 parells de bases amb una temperatura de *melting* Tm d'entre 79 i 82ºC.

Leptina:

- encebador 5': 5'-CCTTCCAGAAACGTGATCCAA-3'
- encebador 3': 5'-GGCCAGCACGTGAAGAAGAT-3'

Resistina:

- encebador 5': 5'-CTGTGTCCCATCGATGAAGCCATC-3'
- encebador 3': 5'-ACAGCAGCGGGCTGCTGTCCAGTC-3'

SPARC:

- encebador 5': 5'-ACATCGGGCCTTGCAAATAC -3'
- encebador 3': 5'-CAGTCAGAAGGTTGTTGTCCTCAT-3'

TNFα:

- encebador 5': 5'-TCTCGAACCCCGAGTGACA -3'
- encebador 3': 5'-GGCCCGGCGGTTCA-3'

Adiponectina:

- encebador 5': 5'-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3'
- encebador 3': 5'-GTCCCCTTCCCCATACACTT-3'
- fragment de 129 pb (excepcionalment més gros a causa que els encebadors usats no van funcionar)

10. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR: RMN

La formació de peroxovanadat en la reacció catalitzada per l'SSAO en presència de vanadat s'ha estudiat mitjançant l'anàlisi dels espectres de ^{51}V-RMN en l'espectròmetre *Varian Unity* a 78,84 MHz i a 37ºC.

MATERIALS

- SSAO recombinant humana cedida per BioTie (Turku, Finlàndia) amb una activitat de 400 nmol/min/mg de proteïna (amb 1 mM benzilamina) i una concentració de 86 μg/ml.
- H_2O_2 (Sigma)
- Aigua deuterada (D_2O)

PROCEDIMENT

1. Es prepara en un tub Eppendorf 1 ml de solució que conté els components desitjats i un 20% de D_2O: 5 mM vanadat, 5 mM benzilamina, 1 mM H_2O_2 i/o 425 μl de proteïna SSAO recombinant humana.
2. Es trasllada la mescla a un tub d'espectròmetre de 5 mm i s'incuba a 37ºC dins de l'aparell mentre es realitza l'adquisició de l'espectre ^{51}V-RMN.

Condicions de l'espectròmetre:

- S'estabilitza la freqüència de camp dissolent les mostres en D_2O.
- S'utilitzen amplades espectrals de 380 ppm (78,84 MHz), angles de pols de 90º i temps d'acumulació de 0,5 segons.
- Els desplaçaments químics s'han referenciat de manera externa respecte del $VOCl_3$ (0 ppm).
- S'aplica una *line-broadening* exponencial de 10 Hz abans de la transformació de Fourier.

APÈNDIX I: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL

Tampó citrat sòdic 50 mM a pH 4,5, per a 50 ml en aigua:

citrat trisòdic· $2H_2O$ 735 mg

PBS (tampó fosfat salí), per a 1 litre de PBSx5 en aigua:

NaCl	136 mM	40 g
KCl	2,7 mM	1 g
Na_2HPO_4	8 mM	7,2 g
KH_2PO_4	1,5 mM	1,15 g

El pH s'ajusta a 7,4 amb HCl.
Si s'ha d'utilitzar per a cultius cel·lulars, cal autoclavar la solució.

TBS (tampó tris salí) a pH 7,5, per a 1 litre de TBSx10 en aigua:

Tris HCl	500 mM	78,8 g
NaCl	1,5 M	27,66 g

TPK (tampó fosfat potàssic) 200 mM pH 7,6:

K_2HPO_4 200 mM 34,84 g/l
KH_2PO_4 200 mM 27,2 g/l

El TPK es prepara mesclant el KH_2PO_4 amb K_2HPO_4 en proporció 1:4 fins a ajustar el pH a 7,6.

Tampó d'incubació d'adipòcits aïllats de rata:

Aquest tampó es prepara a partir de solucions de sals concentrades que es guarden a 4ºC fins al moment de la seva utilització:

NaCl	154 mM	(9 g/l)
Mg SO_4	154 mM	(9,55 g / 250 ml)
$CaCl_2$	110 mM	(4,04 g / 250 ml)
KCl	154 mM	(2,87 g / 250 ml)
Na H_2 $PO_4 \cdot 2H_2O$	200 mM	(13,79 g / 500 ml)
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	200 mM	(8,95 g / 250 ml)
Hepes	75 mM	(8,95 g / 500 ml)

A partir de les solucions de sals esmentades es prepara el tampó incomplet (tampó d'incubació sense piruvat sòdic ni albúmina bovina). El tampó incomplet es pot guardar entre 30 i 45 dies a 4ºC.

Per preparar 1,3 l de tampó incomplet:

NaCl	1 l
Mg SO_4	10 ml
$CaCl_2$	12 ml
KCl	50 ml
Na H_2 PO4·$2H_2O$	6,5 ml
Na2HPO4·2H2O	6,5 ml
Hepes	215 ml

El dia de l'experiment es prepara el tampó d'incubació definitiu gasejant el tampó incomplet durant 5 minuts i afegint-hi:

Piruvat sòdic	2 mM
BSA (fracció V)	2% (p/v)

HES (pH 7,4):

Hepes	20 mM
EDTA	1 mM
Sacarosa	255 mM

Tampó KRHB (*Krebs-Ringer Hepes Buffer*) (pH 7,4) per a 100 ml en aigua:

Sol A	5 ml
Sol B	1 ml
Sol C	1 ml
Hepes	476,5 mg

Es gaseja 15 minuts amb carbogen (O_2:CO_2, 95:5) i s'ajusta a pH 7,4.

Aquest tampó es prepara el mateix dia de l'experiment a partir de solucions de sals concentrades:

sol A:	NaCl	360 mM	160 g/l
sol B:	$MgSO_4$, $7H_2O$	118 mM	29,2 g/l
	KH_2PO_4	118 mM	16,1 g/l
	KCl	470 mM	35 g/l
sol C:	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	250 mM	37,3 g/l

Tampó d'homogeneïtzació, HES (pH 7,4) + inhibidors de proteases:

Hepes	25 mM
EDTA	4 mM
Sacarosa	250 mM
Aprotinina	1 TIU (tripsin inhibitor unit)/ml
Benzamidina	25 mM
PMSF	200 μM
Leupeptina	1 μM
Pepstatina A	1 μM

Es prepara moments abans d'utilitzar-lo i es manté en gel.

Tampó d'homogeneïtzació amb inhibidors de fosfatases, per a 10 ml en aigua:

Hepes	50 mM	400 μl de solució 1,25 M
NaCl	150 mM	45 mg
EDTA	10 mM	500 μl de 0,2 M
$Na_4P_2O_7$	10 mM	26,6 mg
NaF	100 mM	41,9 mg
Vanadat	2 mM	1 ml de 20 mM
Leupeptina	2 μM	10 μl de 2 mM
Pepestatina	2 μM	20μl d'1 mM
PMSF	0,5 mM	50 μl de 0,1 M

Els inhibidors de fosfatases són tòxics i cal pesar-LO amb mascareta.

Tampó Tris amb inhibidors de proteases i fosfatases, usat en els experiments de la PKB

Tris-HCl	50 mM pH 7,5
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Tritó-X-100	1%
$Na_4P_2O_7$	5 mM
NaF	50 mM
Vanadat	1 mM
Sacarosa	270 mM
β-mercaptoetanol	0,1%
PMSF	0,1 mM
Benzamidina	1 mM

Tampó d'electroforesi d'RNA MOPSx10:

MOPS pH 7	0,2 M
Acetat sòdic	0,5 M
EDTA	10 mM

S'esterilitza i es guarda a temperatura ambient protegit de la llum.

Tampó d'electroforesi de DNA TAEx50 (tampó tris-acetat-EDTA):

Trizma base (Sigma)	2 M
Àcid acètic	1 M
EDTA	50 mM

Es conserva a temperatura ambient.

Tampó de càrrega x 5 de DNA:

EDTA	40 mM
SDS	0,1%
Ficoll-400	30%
Blau de bromofenol	0,2%

Es conserva aliquotat a -20ºC.

APÈNDIX II: ANTICOSSOS USATS PER TRANSFERÈNCIA *WESTERN BLOT*

II.1. ANTICOSSOS PRIMARIS

SSAO: 1) anticòs monoclonal de rata contra la proteïna de humana proporcionat per la Dra. Sirpa Jalkanen de la Universitat de Turku (Finlàndia), aquest anticòs reconeix molt bé la proteïna de ratolí; 2) anticòs policlonal de conill contra la proteïna de pulmó boví proporcionat per la Dra. Mercedes Unzeta, de la Universitat Autònoma de Barcelona (Lizcano *et al.*, 1998).

GLUT4: anticòs policlonal de conill OSCRX dirigit contra l'extrem C-terminal de la proteïna de rata. Obtingut al nostre laboratori per la Dra. Conxi Mora (Gumà *et al.*, 1992).

GLUT1: anticòs policlonal de conill anti-GLUT1 contra l'extrem C terminal d'un pèptid sintètic, reconeix el GLUT1 humà, de ratolí i de rata. (Diagnostic International núm.RaGLut-1-IG).

ß1-integrina: anticòs policlonal de conill obtingut contra la proteïna de rata (Pujades *et al.*, 1992). Proporcionat pel Dr. C. Enrich Bastús, de la Universitat de Barcelona.

Antifosfotirosina: anticòs monoclonal de ratolí comercial de Transduction Laboratories

(clone PY20, núm. P11120).

α-amilasa: anticòs policlonal de conill contra la proteïna humana (Sigma, núm. A-8273).

IAPP (*Islet Amyloid Polypeptide*): anticòs policlonal de conill Paul i dirigit contra la proteïna madura sencera (37 aa), el qual reconeix la proteïna humana de rata i de ratolí. Desenvolupat per la Dra. Anne Clark, Radcliffe Infirmary, Universitat d'Oxford (Anglaterra).

PKB: anticossos policlonals de conill contra la Ser 473 i la Thr 308 que reconeixen la proteïna humana, de rata i de ratolí (Cell Signalling núm. 9271 i 9275, respectivament).

II.2. ANTICOSSOS SECUNDARIS

S'han utilitzat diferents anticossos secundaris depenent de l'espècie on ha estat desenvolupat l'anticòs primari:

- Anticòs secundari produït en cabra i acoblat a HRP contra IgG de rata (**HRP-conjugated goat anti-rat-IgG solution**, Sigma núm. A-9037). Aquest anticòs s'ha utilitzat a una dilució 1/2000.
- Anticòs secundari produït en burro i acoblat a HRP contra IgG de ratolí (**HRP-conjugated donkey anti-mouse-IgG**, Jackson núm. 715-035-150). Aquest anticòs s'ha utilitzat contra els anticossos primaris monoclonals a una dilució 1/25000 en llet 1% PBS.
- Anticòs secundari produït en burro i acoblat a HRP contra IgG de conill (**HRP-conjugated donkey anti-rabbit-IgG,** Jackson núm. 711-035-152). Aquest anticòs s'ha utilitzat contra els anticossos primaris policlonals a una dilució 1/25000 en llet 1% PBS.

II.3. PERCENTATGE D'ACRILAMINDA DEL GEL, SOLUCIONS DE BLOQUEIG I RENTAT I DILUCIONS PER A CADA ANTICÒS

SSAO

Gel 10%: (97 kDa el monòmer, 200 kDa el dímer)
Anticòs proporcionat per la Dra. Sirpa Jalkanen.
Bloqueig: llet al 10% en PBS.
Primari: 0,1% Tween, 0,8% gelatina de peix, 5 μl de l'anticòs TK10-79 (aliquotat a -80ºC) en PBS, no es recicla.
Rentats: PBS + 0,2% Tween.
Secundari: antirata 1/2000 en llet 1%.

Anticòs proporcionat per la Dra. Mercedes Unzeta.
Bloqueig: 20 mM TPK PH 7,2, 155 mM NaCl, 8% gelatina de peix, 0,2% Tween.
Primari: 1/100 en solució de bloqueig i llet al 2%, es conserva a 4ºC.
Rentats: 20 mM TPK PH 7,2, 150 mM NaCl, 0,2% Tween.
Secundari: anticonill 1/1000 en solució de rentat.

GLUT 4

Gel: 10% (45 kDa)
Bloqueig: llet al 5% en PBS
Primari: 1/500 del sèrum, 0,02% NaN_3 en llet al 5%, es conserva a -20ºC.
Rentats: PBS + 0,01% Tritó-X-100.
Secundari: anticonill 1/2000 en llet 1%.

GLUT 1

Gel: 10% (43 kDa)
Bloqueig: llet al 5% en PBS.
Primari: 0,1% Tween, 1% BSA, 0,02% NaN_3 en PBS, es conserva a 4ºC.
Rentats: PBS + 0,1% Tween.
Secundari: anticonill 1/1000 en llet 1%.

β_1 – INTEGRINA

Gel: 10% (125-130 kDa)
Bloqueig: llet al 5% en PBS.
Primari:. 0,1% Tween, 1% BSA, 0,02% NaN_3 en PBS, es conserva a 4ºC
Rentats: PBS + 0,1% Tween.
Secundari: anticonill 1/1000 en llet 1%.

ANTI-FOSFO-TIROSINA

Gel: 7% (IRS-1, 167kDA, IRS-3, 66 kDa)
Bloqueig: 20 mM Tris PH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,1% Brij, 1% ovoalbúmina, 1% BSA, en aigua.
Primari: 1/2000 en solució de bloqueig, es conserva a 4ºC.
Rentats: PBS + 0,01% Tritó-X-100.
Secundari: antiratolí 1/25000 en solució de bloqueig.

IAPP

Gel: 20% (4 kDa) amb tampó tricina
Bloqueig: llet al 6% en TBS, Tween 0,1%.
Primari: 1/100 del sèrum en solució de bloqueig, 0,02% NaN_3, es conserva a 4ºC.
Rentats: PBS + 0,1% Tween.
Secundari: anticonill 1/1000 en llet 1% preparada en solució de rentat.

α-amilasa

Gel: 20% (53 kDa) amb tampó tricina
Bloqueig: llet al 5% en PBS.
Primari: 1/500 en llet l'1%, 0,02% NaN_3, es conserva a 4ºC.
Rentats: PBS + 0,2% Tween.
Secundari: anti-conill 1/1000 en llet 1% en solució de rentat.

PKB (Ser 473 i Thr 308)

Gel: 4-12% (60 kDa)
Bloqueig: llet al 10% en PBS + 0,2% Tween.
Primari: 1/1000 en TBS, 2% BSA i 0,2% Tween.
Rentats: TBS + 0,2% Tween.
Secundari: anticonill 1/3000 en llet 1%.

IV. RESULTATS

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts en la tesi en forma de tres articles publicats entre els anys 2000 i 2003 i un article pendent d'acceptació. Cada publicació va acompanyada d'un resum dels resultats i la discussió que se'n deriva.

1. EFECTES DE L'ADMINISTRACIÓ COMBINADA DE BENZILAMINA I VANADAT *IN VIVO* SOBRE LES CONCENTRACIONS PLASMÀTIQUES DE GLUCOSA I INSULINA EN RATES I ESTUDIS COMPLEMENTARIS SOBRE LA VIA DE SENYALITZACIÓ ACTIVADA

Els resultats d'aquest apartat es recullen a l'**Article 1**:

Substrates of semicarbazide-sensitive amine oxidase co-operate with vanadate to stimulate tyrosine phosphorylation of insulin-receptor-substrate proteins, phosphoinositide 3-kinase activity and GLUT4 translocation in adipose cells

Biochemical Journal 350:171-180, 2000

Gemma Enrique-Tarancón, Isabelle Castan, Nathalie Morin, Luc Marti, **Anna Abella**, Marta Camps, Roser Casamitjana, Manuel Palacín, Xavier Testar, Eva Degerman, Christian Carpéné and Antonio Zorzano

Contribució:

- Administració *in vivo* de la combinació de benzilamina i vanadat en rates, mesures de glucèmia i insulinèmia.

- Estudis addicionals d'activitat proteïna-quinasa B (PKB).

1.1. EFECTES DELS SUBSTRATS DE L'SSAO SOBRE EL TRANSPORT DE GLUCOSA I LA TRANSLOCACIÓ DE GLUT4

Les conclusions que es desprenen de la primera part d'aquest treball realitzat per la Dra. Gemma Enrique-Tarancón són les següents:

1. En adipòcits aïllats de rata, l'estimulació del transport de glucosa per benzilamina i vanadat és conseqüència d'un augment de GLUT4 a la membrana plasmàtica de la cèl·lula (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998) (figura 1, article 1).

2. Altres substrats de l'SSAO, com la metilamina, la *N*-decilamina, la β-feniletilamina, la histamina, la *N*-acetilputrescina i la triptamina, estimulen el transport de glucosa en els adipòcits aïllats de rata en presència de vanadat (taula 1, article 1), per tant aquest no és exclusiu de la benzilamina i la tiramina (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998) sinó que es fa extensiu a altres substrat de l'SSAO i reforça la idea que el transport de glucosa és més una conseqüència de la producció de peròxid d'hidrògens que de la producció de l'aldehid. Aquesta observació concorda amb estudis previs on s'observà que l'addició de catalasa bloqueja els efectes de la benzilamina i el vanadat sobre el transport de glucosa (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998).

3. Els efectes sobre el transport de glucosa no són exclusius d'adipòcits aïllats de rata (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998) sinó que també s'observen en altres models d'adipòcits com els adipòcits 3T3-L1, una línia cel·lular d'adipòcits de ratolí (taula 2, article 1). En aquest model el transport de glucosa també és degut a un reclutament de GLUT4 a la membrana plasmàtica (figura 2, article 1).

1.2. ELS SUBSTRATS DE L'SSAO ACTIVEN VIES DE SENYALITZACIÓ SEMBLANTS A LES ACTIVADES PER LA INSULINA EN CÈL·LULES ADIPOSES

A fi d'assajar el mecanisme involucrat en els efectes dels substrats de l'SSAO es van examinar els efectes de la combinació de substrats de l'SSAO i vanadat sobre el receptor de la insulina (IR), els substrats del receptor de la insulina (IRS) i la proteïna fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) en adipòcits aïllats de rata.

Mentre que la incubació amb insulina causa una marcada estimulació de la fosforilació en tirosines de la subunitat β del receptor de la insulina, la benzilamina i el vanadat només van causar una estimulació moderada (figura 3, article 1) que corresponia al 15% de la

fosforilació detectada amb concentracions supramàximes d'insulina. Aquest resultat suggereix que l'activitat quinasa del receptor de la insulina no és la principal proteïna tirosina-quinasa involucrada en el senyal dependent d'SSAO.

També s'observà que la combinació dels substrats de l'SSAO i vanadat estimula la fosforilació en tirosines dels IRS i activen la PI3K, components crucials en la via de transducció del senyal de la insulina.

Les observacions següents permeten concloure que els substrats del receptor de la insulina IRS-1 i IRS-3 es fosforilen en tirosines en resposta a la combinació de benzilamina i vanadat o tiramina i vanadat: a) els substrats de l'SSAO i el vanadat estimulen la fosforilació en tirosines dels immunoprecipitats d'IRS-1 (figura 4 A, article 1), b) els substrats d'SSAO i vanadat estimulen la fosforilació en tirosines d'IRS-1 i IRS-3 coimmunoprecipitats amb la subunitat p85 de la PI3K (figura 4 B, article 1). A més a més, s'observa que la fosforilació en tirosines d'IRS-3 per la combinació de benzilamina i vanadat és més important que la d'IRS-1 i més important que la induïda per la insulina (figura 4 B, article 1).

IRS-3 és una proteïna de 60 kDa identificada com un membre de la família dels substrats del receptor de la insulina (Lavan *et al.*, 1997; Sciacchitano and Taylor, 1997). IRS-3 interacciona ràpidament amb la subunitat p85 de la PI3K després de l'estimulació d'adipòcits de rata amb insulina (Smith-Hall *et al.*, 1997) i està implicada principalment en l'acostament de la PI3K a la membrana plasmàtica en absència d'IRS-1 (Kaburagi *et al.*, 1997). En aquest sentit, les dades obtingudes sembla que indiquen que en resposta a substrats de l'SSAO i vanadat IRS-3 és la principal proteïna IRS activada mentre que IRS-1 està estimulada predominantment després de l'acció de la insulina. En aquestes condicions experimentals no s'ha detectat fosforilació en tirosines d'IRS-2.

L'activació de la PI3K per la combinació de substrats de l'SSAO i vanadat es conclou a partir de les dades següents: a) la subunitat p85 de la PI3K s'associa amb IRS-1 i IRS-3 després de la incubació amb benzilamina o tiramina i vanadat (figura 4 B, article 1), b) l'activitat PI3K està augmentada per benzilamina i vanadat o tiramina i vanadat en els immunoprecipitats de p85 (taula 3, article 1), i c) la wortmanina, un inhibidor de la PI3K, inhibeix completament el transport de glucosa (taula 4, article 1) i el reclutament de GLUT4 a la membrana plasmàtica (figura 5, article 1) que es produeix en presència de benzilamina i vanadat. Com que p85 coimmunoprecipita amb IRS-1 i IRS-3 es conclou que l'activació de PI3K observada és el resultat de la interacció de la subuninat p85 tant amb IRS-1 com amb IRS-3.

Seguint en la cascada d'estimulació per la insulina una altra proteïna-quinasa que sembla que hi està implicada és la proteïna-quinasa B (PKB). Per aquest motiu vam assajar

l'activitat PKB i la seva fosforilació en presència de la combinació de benzilamina i vanadat. La figura 1 mostra els resultat obtinguts on s'observa que en homogenats d'adipòcits incubats amb la combinació de benzilamina i vanadat hi ha una activitat PKB α i γ que correspon al 50% de l'activació obtinguda en presència d'insulina (figura 1 A) i que els residus serina 473 i treonina 308, indispensables perquè la PKB sigui activa, estan fosforilats (figura 1 B). Atès que s'ha descrit que la treonina 308 es fosforila per la PDK1 (Alessi *et al.*, 1997) i que la serina 473 es fosforila per la PDK2 (vegeu el punt 1.1.2. de la introducció), és probable que aquestes proteïnes-quinasa també estiguin actives en la via estimulada per la benzilamina i el vanadat.

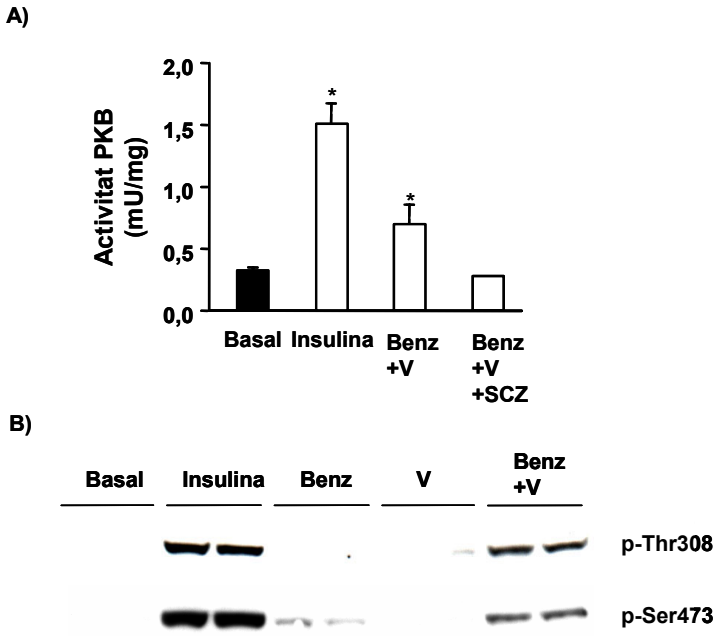


Figura 1. Activitat PKB en presència de benzilamina i vanadat. Es van incubar adipòcits aïllats de rata en condicions basals durant 5 minuts amb 100 nM insulina o durant 30 minuts en presència de 100 μM benzilamina (Benz), 100 μM vanadat (V) o la combinació del tots dos (Benz + V). També es van incubar adipòcits en presència d'1 mM de semicarbazida (SCZ) 15 minuts abans de l'addició de la benzilamina i vanadat (Benz + V + SCZ). **A:** Activitat PKB α+γ als homogenats. **B:** Assaig de transferència *Western blot* revelat amb anticossos específics contra la serina 473 i la treonina 308. Es mostra un revelat representatiu. Resultats obtinguts en col·laboració amb el Dr. Jose Miguel Lizcano.

1.3. LA COMBINACIÓ DE BENZILAMINA I VANADAT ADMINISTRADA *IN VIVO* DISMINUEIX LES CONCENTRACIONS DE GLUCOSA EN SANG

A fi de comprovar si la combinació de benzilamina i vanadat té efectes sobre la glucèmia *in vivo* es van administrar intravenosament diferents dosis de benzilamina i vanadat a rates *Wistar*. Trenta minuts després de l'administració es va obtenir plasma per mesurar la glucèmia i la insulinèmia. A la taula 5 de l'article 1 es mostren els resultats obtinguts. La dosi de 7 μmol/kg de pes corporal de benzilamina en combinació amb 20 μmol/kg de vanadat va causar una reducció del 16% en els nivells de glucosa plasmàtica

dels animals sense afectar els nivells circulants d'insulina. La combinació de benzilamina amb 10 μmol/kg de vanadat o la benzilamina i el vanadat per separat no van modificar ni la glucèmia ni la insulinèmia dels animals.

Aquests resultats previs en els quals se suggereix que la combinació de benzilamina i vanadat podria regular la captació de glucosa *in vivo* ens van portar a ampliar els experiments i han donat com a resultat els articles 2 i 3 que es presenten a continuació.

2. EFECTES DE LA COMBINACIÓ DE BENZILAMINA I VANADAT SOBRE EL METABOLISME GLUCÍDIC EN RATES DIABÈTIQUES PER ESTREPTOZOTOCINA

Els resultats d'aquest apartat es recullen a l'**Article 2**:

Combined Treatment With Benzylamine and Low Dosages of Vanadate Enhances Glucose Tolerance and Reduces Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Diabetes, 50:2061-206, 2001

Luc Marti*, **Anna Abella***, Christian Carpéné, Manuel Palacín, Xavier Testar and Antonio Zorzano

* Els dos primers autors comparteixen titularitat.

L'objectiu principal d'aquest apartat ha estat examinar si la combinació de substrats de l'SSAO, com ara la benzilamina i el vanadat presenten efectes insulinomimètics *in vivo*. Per fer-ho vam analitzar els efectes de l'administració aguda i crònica de benzilamina i vanadat en animals control i en animals diabètics per estreptozotocina, un model de diabetis de tipus 1.

2.1. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA EN RATES NO DIABÈTIQUES I EN RATES DIABÈTIQUES PER ESTREPTOZOTOCINA (STZ)

Després dels estudis ja comentats *in vivo* sobre l'efecte de la combinació de benzilamina i vanadat en la glucosa i la insulina plasmàtiques que demostraven efectes hipoglucemiants d'aquesta combinació, es van realitzar estudis de tolerància a la glucosa tant en animals no diabètics com en animals diabètics per estreptozotocina.

En el cas dels animals no diabètics, de la soca *Wistar*, la injecció intravenosa de 20 μmol/kg de pes corporal de vanadat i 7 μmol/kg de benzilamina va causar un increment en la tolerància a la glucosa del 35% (figura 1, article 2), mentre que l'administració de només un dels components no la va modificar. Els canvis observats es van produir sense modificacions en els nivells d'insulina plasmàtica (taula 1, article 2 i figura 2).

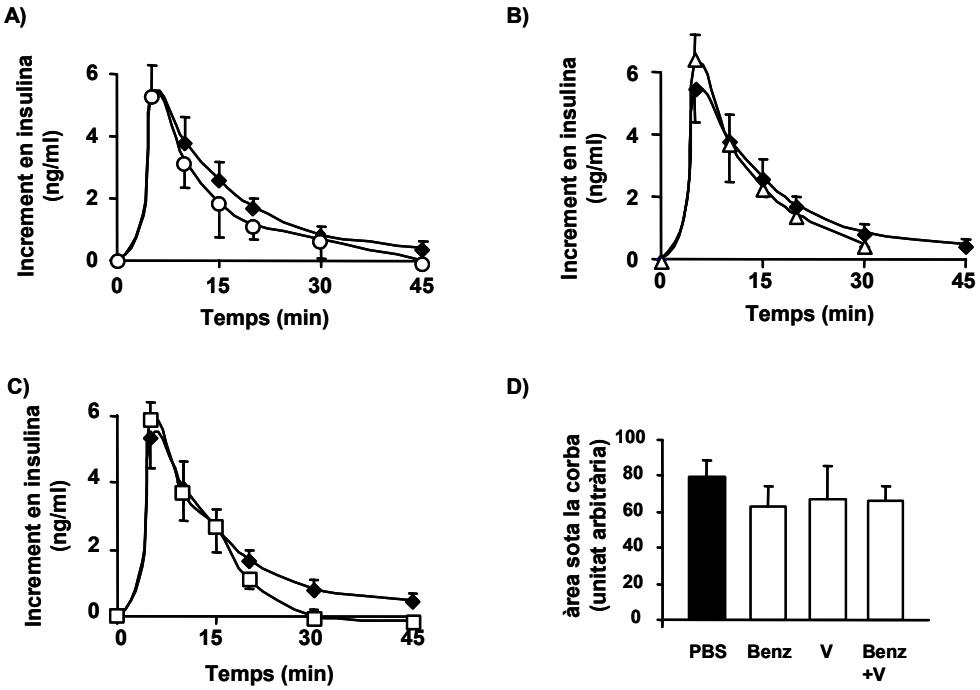


Figura 2. Efecte de l'administració aguda de benzilamina i vanadat sobre la insulinèmia durant el test de tolerància a la glucosa. Trenta minuts després de l'administració de glucosa per la vena safena (0,8 g/kg pes corporal) s'administrà el vehicle PBS (**A**, **B** i **C**, rombes negres), 20 μmol/kg vanadat (A, rodones blanques), 7 μmol/kg benzilamina (**B**, triangles blancs) o benzilamina i vanadat (**C**, quadrats blancs). Es prengueren mostres de sang a diferents temps i es determinà la insulinèmia. Els resultat s'expressen com increments d'insulina en plasma. La insulinèmia a temps zero era de 1,0 ± 0,2, 1,1 ± 0,4 1,1 ± 0,1, i 1,0 ± 0,1 ng/ml en els grups control, vanadat, benzilamina i benzilamina i vanadat, respectivament. **D:** Àrea sota la corba. Els resultats són la mitjana ± SE de 4-8 observacions per grup i corresponen a de les dades presents a A, B i C. Benz, benzilamina; V, vanadat.

Per a comprovar que els efectes observats depenen de l'activitat SSAO es va realitzar el test de tolerància a la glucosa en condicions on aquesta activitat es troba inhibida. Per aquest motiu, es van tractar rates amb 5 mg/kg/dia de semicarbazida durant 3 dies. Quan es determinà el transport de glucosa en adipòcits aïllats d'aquests animals s'observà que la combinació de benzilamina i vanadat ja no era capaç d'estimular el transport de glucosa (figura 3).

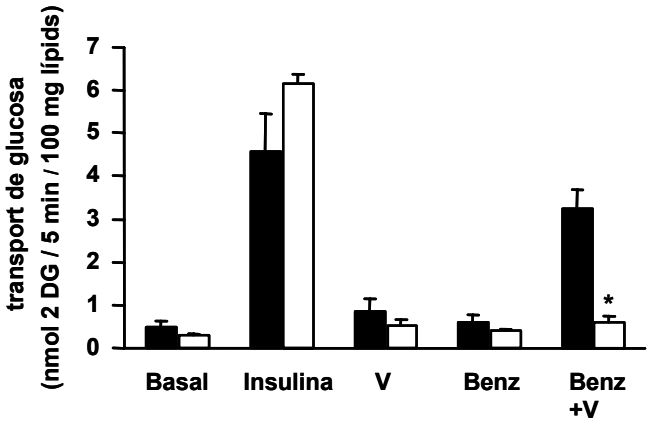


Figura 3. Efecte del tractament per semicarbazida sobre el transport de glucosa en adipòcits aïllats. Es van aïllar adipòcits de rates control (barres negres, n = 5) i rates tractades durant tres dies amb 5 mg/kg de semicarbazida (barres blanques, n = 3) i s'assajà el transport de glucosa en condicions basals o estimulat per 100 nM insulina, 100 μM vanadat (V), 100 μM benzilamina (Benz) o la combinació de benzilamina i vanadat. Els resultats són la mitjana ± SE de 3-5 observacions per grup. * $p < 0,01$ respecte de les rates control.

Si es fa el test de tolerància a la glucosa en aquestes condicions, on l'SSAO de teixit adipós es troba inhibida, els efectes de millora de la tolerància a la glucosa observats en

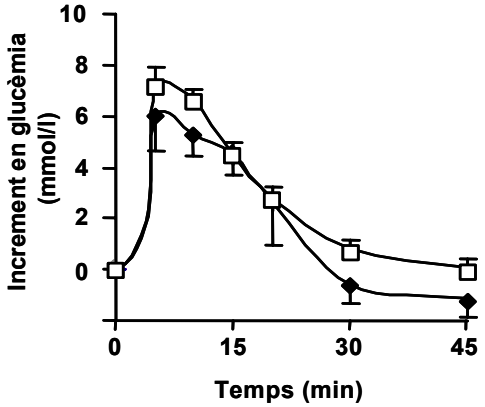


Figura 4. Els efectes de la benzilamina i el vanadat observats sobre la tolerància a la glucosa en animals no diabètics depenen de l'SSAO. Es realitzà un test de tolerància a la glucosa (administració per vena safena, 0,8 mg/kg) en animals controls (rombes negres) i en animals que havien estat tractats durant tres dies amb semicarbazida (5 mg/kg/dia) i que havien rebut benzilamina i vanadat 30 minuts abans de l'administració de la glucosa (quadrats blancs). Els resultats són la mitjana ± SE de 4-6 animals per grup.

administrar benzilamina i vanadat desapareixen (figura 1D, article 2 i figura 4). Aquests resultats indiquen que cal l'activitat SSAO funcional perquè aquests efectes beneficiosos es produeixin.

Seguidament calia veure si els efectes observats sobre la tolerància a la glucosa s'obtenien també en un model animal de diabetis. Es va induir diabetis per injecció d'estreptozotocina (70 mg/kg de pes corporal i.p.) en rates *Wistar* de 250 g, mètode que destrueix selectivament les cèl·lules β del pàncrees i que, per tant, mimetitza la diabetis *mellitus* de tipus 1 humana. Els adipòcits aïllats d'aquests animals presentaven una estimulació màxima del transport de glucosa en resposta a la insulina reduïda (Kasuga *et al.*, 1978; Kobayashi and Olefsky, 1979) (figura 5), indicativa de resistència a la insulina. La resposta a la benzilamina i el vanadat, en canvi, era equivalent a la que presentaven els adipòcits aïllats de rates no diabètiques (taula 2, article 2 i figura 5). Aquesta observació concorda amb estudis publicats on es mostra que el teixit adipós de rates diabètiques per estreptozotocina presenta nivells normals d'activitat SSAO (Conforti *et al.*, 1995).

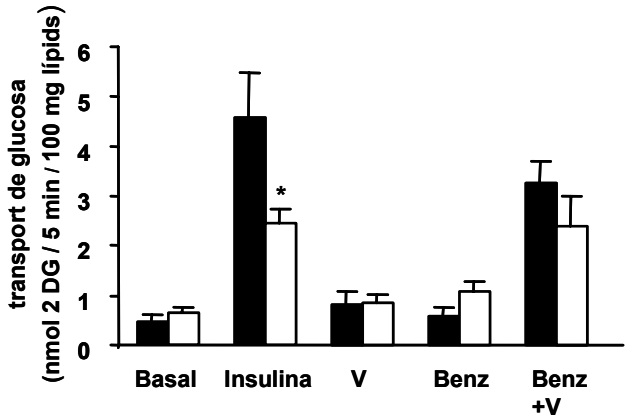


Figura 5. Transport de glucosa en adipòcits aïllats de rates diabètiques per estreptozotocina. Es van aïllar adipòcits de rates control (barres negres, n = 5) i de rates diabètiques de tipus 1 (barres blanques, n = 11) i s'assajà el transport de glucosa en condicions basals o estimulat per 100 nM insulina, 100 μM vanadat (V), 100 μM benzilamina (Benz) o la combinació de benzilamina i vanadat. * p < 0,01 respecte del control. Els resultats són la mitjana ± SE.

En els animals diabètics, la tolerància a la glucosa està disminuïda. Després d'una càrrega externa de glucosa, els nivells plasmàtics assolits són més elevats i es triga més a tornar als nivells basals. Això és degut a la resistència a la insulina dels teixits perifèrics i, en aquest model, també a l'absència de secreció d'insulina.

La tolerància a la glucosa millorà en un 42% en els animals diabètics per estreptozotocina que havien rebut la combinació de benzilamina i vanadat (figura 2 A, article 2); en aquest cas tampoc no es van observar efectes si s'administraven les drogues per separat (figura 2 B, article 2 i figura 6). Com passava en el cas de les rates no diabètiques, la inhibició de l'activitat SSAO amb semicarbazida va impedir els efectes beneficiosos de la benzilamina i el vanadat (figura 2 B, article 2 i figura 6 C).

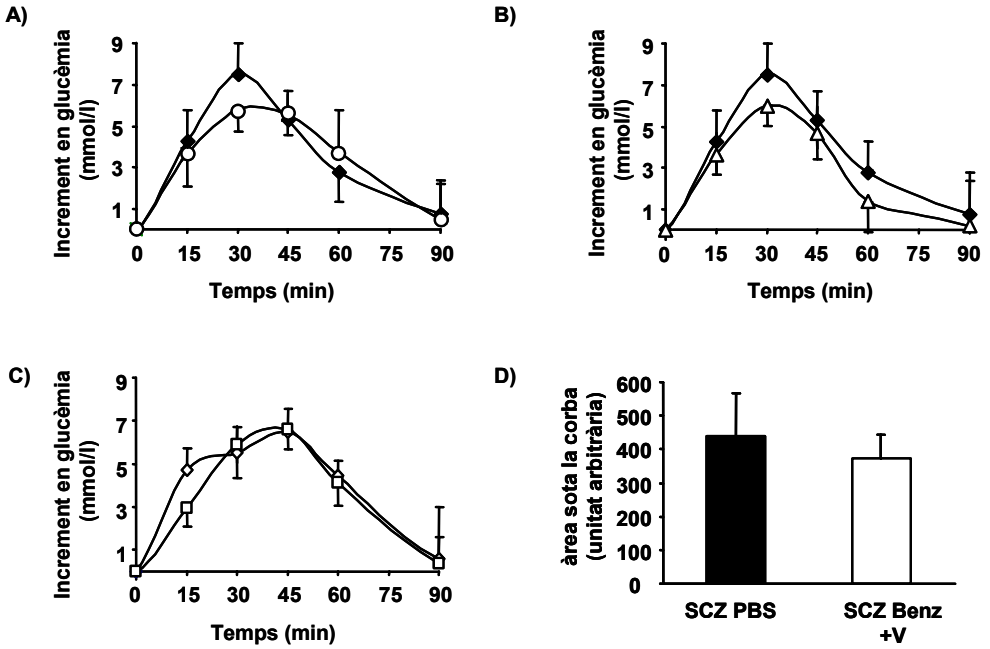


Figura 6. Test de tolerància a la glucosa en rates diabètiques per estreptozotocina. A i B: Canvis relatius en la glucèmia després de la càrrega oral de glucosa (2g/kg de pes corporal) realitzada 15 minuts després de la injecció intravenosa del vehicle PBS (A i B, rombes negres), 20 μmol/kg vanadat (A, cercles blancs) o 7 μmol/kg benzilamina (B, triangles blancs). **C:** Test de tolerància realitzat a rates que havien estat tractades durant 3 dies amb semicarbazida; 15 minuts abans de la càrrega oral de glucosa els animals havien rebut el vehicle PBS (rombes bancs) o la combinació benzilamina i vanadat (quadrats blancs). **D:** Àrea sota la corba en les rates prèviament tractades amb semicarbazida (SCZ). Les concentracions de glucosa al temps zero eren 25,3 ± 1,1 i 26,2 ± 1,1 mmol/l en el grup PBS i benzilamina i vanadat respectivament. Les dades són la mitjana ± SE de 4-6 observacions per grup.

Les rates diabètiques per estreptozotocina es caracteritzen per presentar nivells d'insulina en plasma molt baixos (0,44 ± 0,26 ng/ml en front d'1,1 ± 0,3 ng/ml de rates no diabètiques) atès que l'estreptozotocina destrueix els illots pancreàtics responsables de la seva producció. Durant el test de tolerància a la glucosa no es van observar canvis en els nivells d'insulina circulants, ja que en no haver-hi illots no pot haver-hi resposta a la càrrega de glucosa; el tractament amb benzilamina i vanadat, com calia esperar, no va modificar els nivells circulants d'insulina (taula 3, article 2).

Tant en el cas de les rates no diabètiques com en les rates diabètiques per estreptozotocina no es va observar cap canvi de la quantitat de glucosa excretada per l'orina després del test de tolerància a la glucosa (taula 1). Així doncs, la millora en la tolerància a la glucosa observada després de l'administració de benzilamina i vanadat no es deu a un augment en l'excreció de glucosa per orina.

En rates no diabètiques, quan s'utilitza com a control la florizina, un compost hipoglucemiant que actua augmentant l'excreció de glucosa per orina, s'observà un augment dels nivells de glucosa en orina aproximadament de 2.000 vegades. En els animals que havien rebut la combinació de benzilamina i vanadat l'augment va ser només de 2

vegades la qual cosa és comparable al dels animals control (taula 1).

Taula 1. Concentracions de glucosa a l'orina de rates *Wistar* i rates diabètiques per estreptozotocina (STZ) abans i després del test de tolerància a la glucosa (TTG). Els resultats són la mitjana ± SE de 4-6 observacions per grup. * $p < 0,01$ respecte de la glucosúria abans del TTG.

Rata	Tractament	Glucosa a l'orina abans del TTG (mM)	Glucosa a l'orina després del TTG (mM)
No diabètic	PBS	0,21 ± 0,04	0,38 ± 0,07
	Benz + V	0,20 ± 0,04	0,42 ± 0,09
	Floritzina	0,12 ± 0,06	338 ± 55*
STZ	PBS	542 ± 50	515 ± 55
	Benz + V	467 ± 42	447 ± 43

En rates diabètiques per estreptozotozina, els nivells de glucosa excretats per orina són molt elevats (aproximadament 2.000 vegades més elevats que els nivells dels animals no diabètics) (taula 1). En aquest cas tampoc no es van observar canvis en la quantitat de glucosa excretada després de l'administració de benzilamina i vanadat (taula 1). En el grup que havia rebut la florizina no es van poder determinar els nivells de glucosa en orina després de la càrrega oral de glucosa ja que els valors obtinguts excedien el límit del mètode. L'efecte de la florizina es va seguir, en aquest cas, analitzant la glucèmia durant el test de tolerància a la glucosa tot observant-se que la glucèmia davalla ràpidament sense l'aparició del pic de glucosa característic que segueix a la càrrega oral (figura 7); així doncs, la davallada en els nivell de glucosa en sang és deguda a l'augment de l'excreció per orina.

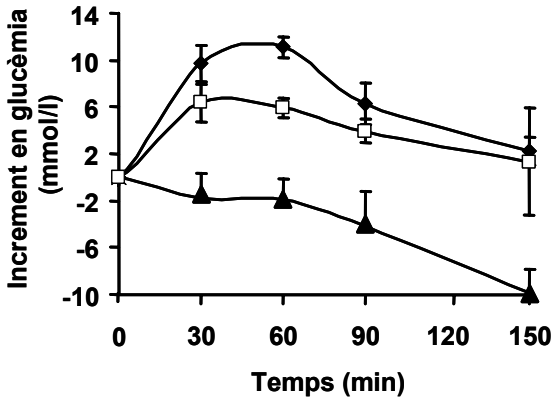


Figura 7. Test de tolerància a la glucosa en rates diabètiques per estreptozotocina. Canvis relatius en la glucèmia després d'una càrrega oral de glucosa (2g/kg de pes corporal) realitzada 15 minuts després d'una injecció intravenosa del vehicle PBS (rombes negres), 7 μmol/kg benzilamina i 20 μmol/kg vanadat (quadrats blancs) o d'una injecció intraperitoneal de 300 mg/kg de florizina (triangles negres). Les concentracions de glucosa al temps zero eren 17,6 ± 1,4, 17,7 ± 2,2 i 18,3 ± 2,1 mmol/l en el grup PBS, benzilamina i vanadat i florizina respectivament. Les dades són la mitjana ± SE de 4 observacions per grup.

El fet que el perfil de concentracions d'insulina plasmàtica i l'absorció renal de glucosa no estiguin alterats suggereix que la combinació de benzilamina i vanadat *in vivo* estimula la captació perifèrica de glucosa després d'una càrrega de glucosa.

2.2. TRACTAMENT CRÒNIC AMB BENZILAMINA I VANADAT DE RATES DIABÈTIQUES PER ESTREPTOZOTOCINA

A fi d'estudiar si la l'administració crònica de la combinació de benzilamina i vanadat podia generar efectes antidiabètics, es van implantar subcutàniment a rates diabètiques per estreptozotocina minibombes osmòtiques que contenien una solució de benzilamina. Els animals rebien de manera contínua una dosi de 84 μmol/kg/dia de benzilamina a través de les minibombes i també se'ls administrava diàriament una injecció intraperitoneal de vanadat (25 o 50 μmol/kg/dia). El tractament crònic amb benzilamina i vanadat va provocar una disminució de la glucèmia dels animals després d'una setmana de tractament (figura 3, article 2). La dosi de vanadat necessària per observar efectes hipoglucemiants de la combinació de benzilamina i vanadat depèn de la glucèmia inicial dels animals sent necessari dosis més elevades com més hiperglucèmics són els animals a l'inici del tractament. Així, segons la dosi de vanadat usada i la glucèmia inicial dels animals, el vanadat sol va modificar lleugerament la glucèmia (figura 3 A, article 2). La dosi de benzilamina usada, en canvi, mai no va presentar efectes sobre la glucèmia dels animals (figura 8).

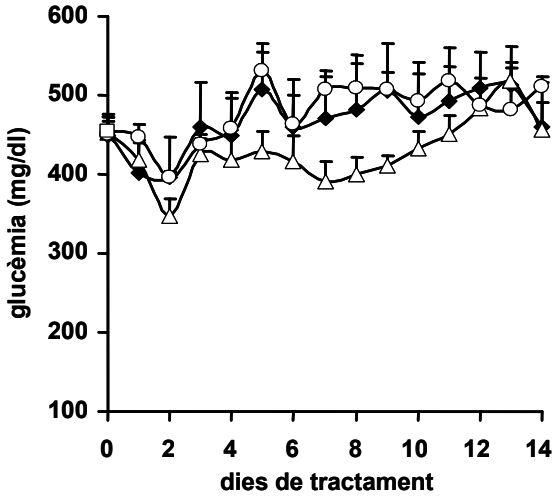


Figura 8. Efecte del tractament crònic amb benzilamina sobre la glucèmia d'animals diabètics per estreptozotocina. Es determinà la glucèmia diàriament en animals control (rombes negres), en animals que rebien 84 μmol/kg/dia de benzilamina per mitjà de la bomba implantada (triangles blancs) i en animals que rebien diàriament una injecció intraperitoneal de vanadat de 25 i 50 μmol/kg durant la primera i segona setmanes de tractament, respectivament (rodones blanques). Els resultats són la mitjana ± SE de 3-6 observacions per grup.

L'aparició dels efectes hipogluceminats es va observar a partir del dia 6-8 de l'inici del tractament (figura 3, article 2). Aquest temps és similar a l'obtingut amb tractaments amb

vanadat i peroxovanadat (Meyerovitch *et al.*, 1987; Yale *et al.*, 1995).

Els animals diabètics per estreptozotocina presenten polifàgia, polidípsia i poliúria. L'administració durant dues setmanes de benzilamina i vanadat va provocar una disminució en el consum de menjar i d'aigua i s'acosta als nivells dels animals no diabètics (taula 4, article 2 i figura 9).

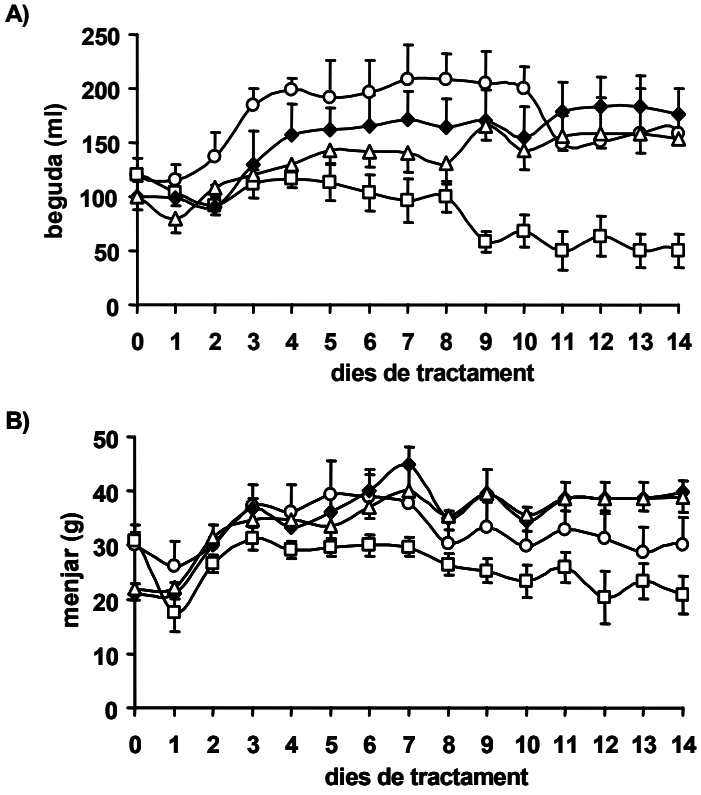


Figura 9. Efecte del tractament crònic amb benzilamina i vanadat sobre el consum d'aigua (A) i menjar (B) d'animals diabètics per estreptozotocina. Els resultats de beguda s'expressen per ml/rata/dia i els de menjar per g/rata/dia en animals control (rombes negres), en animals que rebien 84 μmol/kg/dia de benzilamina per mitjà de la bomba implantada (triangles blancs), en animals que rebien diàriament una injecció intraperitoneal de vanadat de 25 i 50 μmol /kg durant la primera i segona setmana de tractament respectivament (rodones blanques) i en animals que rebien la combinació de benzilamina i vanadat (quadrats balanca). Els resultats són la mitjana ± SE de 3-6 observacions per grup.

En instaurar-se la diabetis en rates *Wistar* s'observà una pèrdua de pes; així, animals no diabètics de la mateixa edat pesen un 15% més. No es van observar diferències de pes produïdes pel tractament (taula 4, article 2).

Respecte al teixit adipós, en instaurar-se la diabetis s'observà una davallada de la seva quantitat d'aquest de més d'un 50% (taula 4, article 2); ens els animals tractats amb benzilamina i vanadat hi va haver un augment del pes de teixit adipós epididimal del 45%. Aquesta tendència en la recuperació de la quantitat de teixit adipós epididimal s'observa també en representar les dades com a percentatge del pes de teixit adipós respecte del pes corporal total (taula 4, article 2 i figura 10).

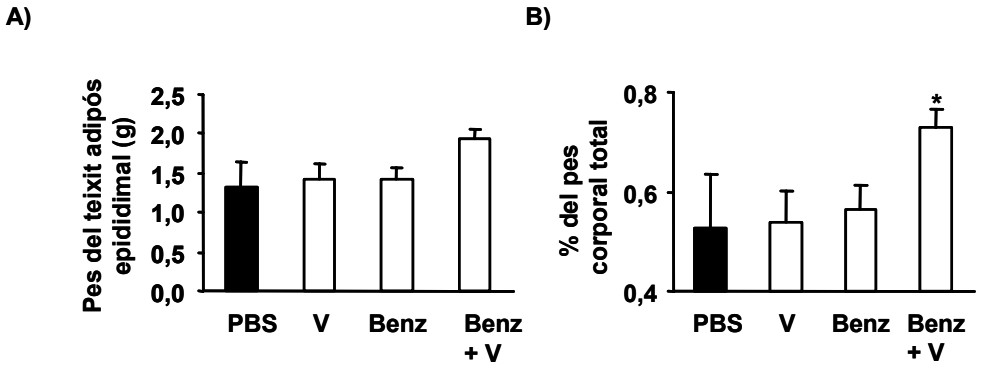


Figura 10. Efecte del tractament crònic amb benzilamina i vanadat sobre el pes del teixit adipós epididimal d'animals diabètics per estreptozotocina. Un cop finalitzat el tractament crònic de les rates diabètiques per estreptozotocina es va extreure el teixit adipós epididimal i se'n va determinar el pes. Els resultats es presenten com a pes absolut del teixit (**A**) i com a percentatge respecte del pes corporal total (**B**). Els resultats són la mitjana ± SE de 6-9 observacions per grup. * $p < 0,05$ respecte del PBS.

Els nivells d'insulina plasmàtica no es van modificar durant el tractament crònic (taula 4, article 2 i taula 2), aquest resultat suggereix que els efectes es produeixen a nivell dels teixits perifèrics que consumeixen glucosa, sensibilitzant-se a la poca insulina que hi ha i/o activant-se una altra via per acció de la benzilamina i el vanadat. En aquest model, el funcionament pancreàtic no es veu afectat; aquest, però, no és un bon model per estudiar possibles efectes pancreàtics ja que amb la inducció de la diabetis es va eliminar la majoria de les cèl·lules productores d'insulina.

Taula 2. Concentracions d'insulina en plasma d'animals diabètics per estreptozotocina abans i després del tractament crònic amb benzilamina i vanadat. Les dades són la mitjana ± SE de 6-9 observacions per grup.

	Insulina (ng/ml)	
STZ	**dia 0**	**dia 14**
PBS	0,64 ± 0,17	0,45 ± 0,07
Vanadat	0,62 ± 0,13	0,56 ± 0,08
Benzilamina + Vanadat	0,53 ± 0,07	0,59 ± 0,07

Per comprovar que la benzilamina present a les bombes era activa durant tot el tractament, ja que en trobar-se a l'interior dels animals estava a 37ºC i podien donar-se processos no controlats, es va recuperar el contingut de les bombes al final del tractament i es va comprovar la seva capacitat per estimular el transport de glucosa en adipòcits aïllats de rates no diabètiques en combinació amb vanadat. Quan es va comparar el grau d'estimulació del transport de glucosa per la combinació de benzilamina preparada fresca i vanadat o benzilamina que provenia de les bombes i vanadat no es van observar diferències (figura 11).

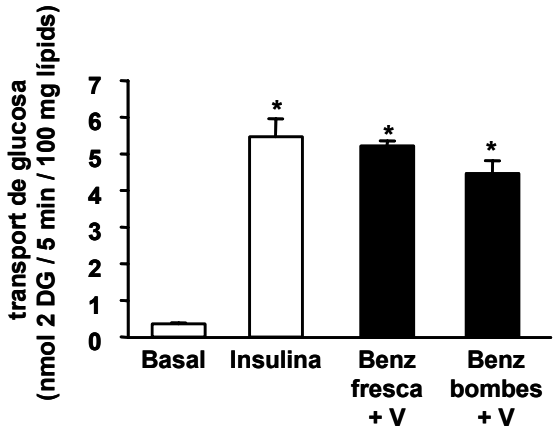


Figura 11. La benzilamina de l'interior de les bombes es activa durant tot el tractament. Es van aïllar adipòcits de rates no diabètiques i es van incubar durant 45 minuts en condicions basals o en presència de 100 nM insulina, la combinació de 100 μM benzilamina preparada fresca i 100 μM vanadat o la combinació de benzilamina que provenia de les bombes del tractament crònic i vanadat, a continuació es dugué a terme el transport de glucosa. Els resultats són la mitjana ± SE de 6 observacions per grup * $p <$ 0,01 respecte el basal.

2.3. METABOLISME GLUCÍDIC EN ELS TEIXITS PERIFÈRICS DE RATES DIABÈTIQUES PER ESTREPTOZOTOCINA DESPRÉS DEL TRACTAMENT CRÒNIC AMB BENZILAMINA I VANADAT

En alguns casos, la presència contínua d'un substrat pot provocar la repressió de l'enzim que el metabolitza. Per aquest motiu, es va voler determinar l'activitat SSAO en els adipòcits dels animals que havien rebut durant dues setmanes benzilamina i vanadat; es van aïllar adipòcits i es va realitzar el transport de glucosa en presència de benzilamina i vanadat, també es van preparar membranes totals i es va testar la capacitat d'oxidar benzilamina que presentaven. Els adipòcits de rates tractades crònicament amb benzilamina i vanadat són capaços de transportar glucosa quan són estimulats amb la combinació dels fàrmacs a nivells similars que els adipòcits de rates no tractades (figura 12 A); a més a més, la seva activitat SSAO no es veu afectada per la presència continuada de benzilamina (figura 12 B).

Un cop finalitzat el tractament crònic, a fi de determinar si els efectes antidiabètics observats eren deguts a una estimulació de la utilització perifèrica de glucosa, es va aïllar el teixit adipós epididimal i perirenal dels animals per estudiar el transport de glucosa *in vitro* i avaluar l'abundància de transportadors de glucosa. També es va aïllar múscul *soleus* i EDL i es va determinar l'abundància de transportadors de glucosa GLUT1 i GLUT4.

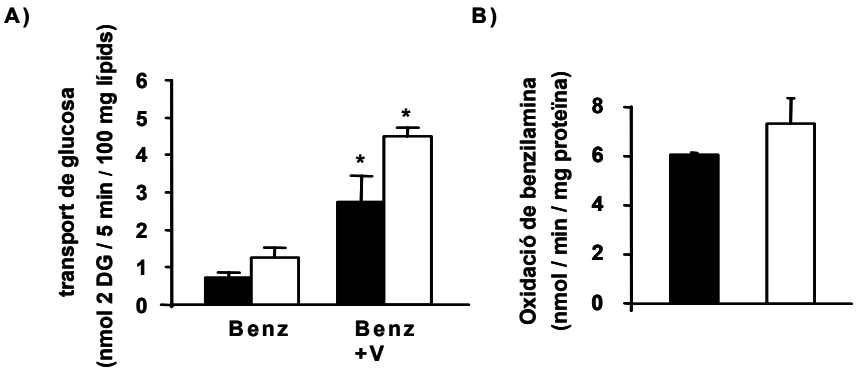


Figura 12. El tractament crònic amb benzilamina no afecta l'activitat SSAO del teixit adipós. Es van aïllar adipòcits de rates diabètiques per estreptozotocina controls (barres negres) o tractades durant dues setmanes amb benzilamina i vanadat (barres blanques) i s'assajà **A:** la capacitat de la combinació de benzilamina i vanadat per estimular el transport de glucosa i **B:** l'activitat SSAO en homogenats totals. Els resultats són la mitjana ± SE de 5-6 observacions per grup. * $p < 0,05$ respecte el transport basal corresponent.

El transport de glucosa en adipòcits aïllats en condicions basals i estimulat per insulina es representa a la figura 4 de l'article 2. Les rates tractades durant dues setmanes amb la combinació de benzilamina i vanadat presenten un augment del transport basal de glucosa, en comparació amb el que presenten les rates diabètiques no tractades, i una normalització del transport estimulat per insulina. Els animals que només han rebut una de les drogues no presenten modificacions del transport de glucosa quan es comparen amb el grup diabètic no tractat (figura 4, article 2).

Així doncs, amb el tractament crònic amb benzilamina i vanadat s'ha recuperat la sensibilitat dels adipòcits a la insulina; a més a més, els nivells de transport obtinguts en presència d'aquesta són comparables al de les rates no diabètiques. Malgrat això, aquesta millor sensibilitat a la insulina no pot explicar, per ella mateixa, els efectes antidiabètics observats *in vivo* atesos els baixos nivells circulants d'insulina en rates diabètiques per estreptozotocina. L'augment del transport basal de glucosa és inversament proporcional a la glucèmia que els animals presenten al final del tractament; així doncs, l'augment del transport basal podria ser, en part, el responsable de la millora en la glucèmia dels animals diabètics tractats amb benzilamina i vanadat (figura 4, article 2).

El transportador responsable del transport basal de glucosa és GLUT1, quan s'analitza per transferència *Western blot* l'abundància de GLUT1 en membranes totals d'adipòcits no s'observa cap diferència entre els diferents tractaments (figura 13); en canvi, la quantitat de GLUT4, transportador responsable del transport de glucosa estimulat per insulina, es troba augmentada (figura 5, article 2). Així doncs, un augment del transportador de glucosa GLUT4, en els adipòcits de rates tractades amb benzilamina i vanadat pot portar a un augment del transport basal de glucosa i contribuir a la normalització de la glucèmia en els animals diabètics. De fet, també s'observa una correlació entre el contingut de GLUT4 i el transport basal de glucosa i una correlació inversament proporcional amb la glucèmia al

final del tractament (figura 14).

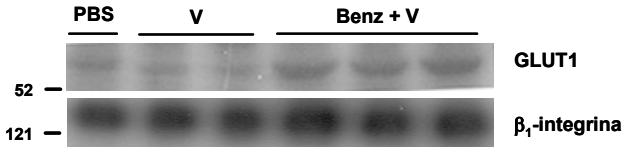


Figura 13. Abundància del transportador de glucosa GLUT1 en adipòcits aïllats de rates diabètiques per estreptozotocina. Es van aïllar adipòcits de teixit adipós procedent de rates tractades crònicament amb PBS, vanadat (V), i benzilamina i vanadat (Benz + V) i es mesurà l'abundància de GLUT1 i de β1-intergrina, com a control de càrrega, present en membranes totals d'aquests adipòcits per transferència *Western blot*. Es mostra un revelat representatiu.

L'augment del transport basal de glucosa tant pot ser degut als efectes aguts de la benzilamina i el vanadat que provoquen un reclutament de GLUT 4 a la membrana plasmàtica cel·lular com a la presència d'una major quantitat de GLUT4. D'altra banda, l'augment del transport de glucosa a les cèl·lules adiposes i la normalització de la glucèmia també podria ser conseqüència d'una major sensibilitat a la insulina provocada per la combinació de fàrmacs administrats de manera crònica.

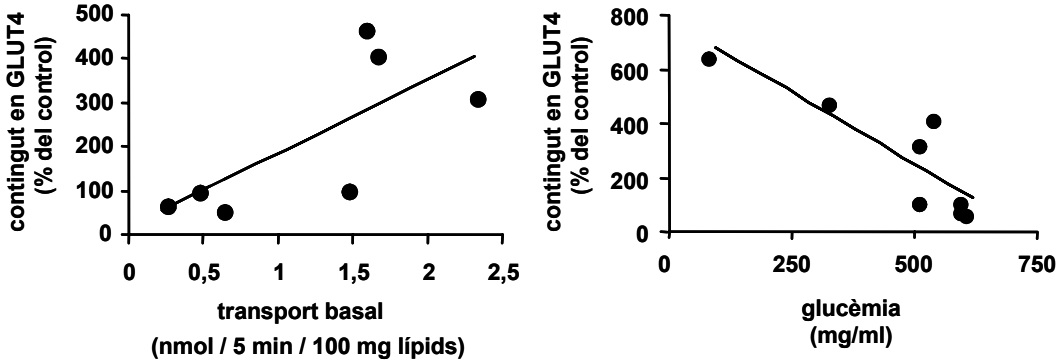


Figura 14. Correlació entre l'abundància de GLUT4 a adipòcits i el transport de glucosa basal o la glucèmia. Es van aïllar adipòcits de teixit adipós procedent de rates tractades crònicament amb PBS, vanadat, benzilamina i benzilamina i vanadat i es mesurà el transport basal de glucosa i l'abundància de GLUT4 present en membranes totals d'aquests adipòcits. **A:** Correlació entre l'abundància de GLUT4 als adipòcits i el transport de glucosa basal (r = 0,87, * $p < 0,01$). **B:** Correlació entre la l'abundància de GLUT4 a adipòcits i la glucèmia al final del tractament (r = 0,73, * $p < 0,01$)

En els adipòcits aïllats també es va analitzar la capacitat del vanadat, la benzilamina o la combinació de benzilamina i vanadat per estimular el transport de glucosa. En tots el casos es va obtenir una millor estimulació del transport de glucosa en el grup que havia estat tractat crònicament amb benzilamina i vanadat que en el grup diabètic control. Aquests resultats suggereixen que el tractament crònic amb benzilamina i vanadat provoca una sensibilització dels adipòcits de manera que, tal com passava en el cas del transport estimulat per insulina, responen millor a estímuls posteriors (figura 4, article 2 i figura 15).

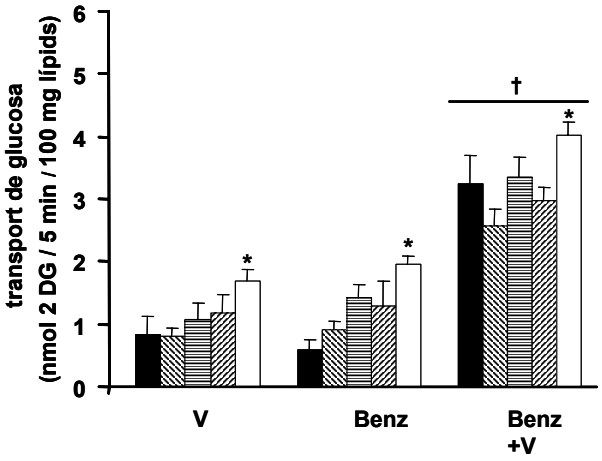


Figura 15. A: El tractament crònic amb benzilamina i vanadat sensibilitza els adipòcits. Es van aïllar adipòcits de rates no diabètiques (□) o de rates diabètiques tractades durant dues setmanes amb el vehicle PBS (■), 25 i 50 μmol/kg/dia vanadat (◪), 84 μmol/kg/dia benzilamina (▬) o la combinació benzilamina i vanadat (◪), i es realitzà el transport de glucosa en presència de vanadat 100 μM, benzilamina 100 μM o la combinació de vanadat i benzilamina. Els resultats són la mitjana ± SE de 4-5 observacions per grup. * $p < 0,05$ indica diferències amb el grup de rates diabètiques que han rebut PBS. † $p < 0,05$ indica diferències amb el transport basal corresponent de cada grup.

El múscul esquelètic és un dels teixits on es consumeix majoritàriament la glucosa circulant en estat absortiu (DeFronzo *et al.*, 1981); en situació de diabetis aquest teixit presenta, com passava amb el teixit adipós, resistència a la insulina. L'activitat SSAO present a múscul esquelètic és molt baixa (taula 3) de manera que és difícil pensar en efectes directes de la combinació de benzilamina i vanadat sobre aquest teixit. El tractament crònic amb benzilamina i vanadat podria, però, estimular la captació de glucosa en el múscul augmentant la seva sensibilitat a la insulina a través d'algun senyal generat en el teixit adipós.

Taula 3. Activitat SSAO en teixit adipós i múscul esquelètic de rata. Els resultats són la mitjana ± SE de 5-6 observacions per grup.

Membranes totals	**activitat SSAO** pmol / min / mg proteïna
Teixit adipós	7937 ± 219
Múscul vermell	37 ± 7
Múscul blanc	67 ± 16

A fi de comprovar aquesta hipòtesi, es va assajar el possible efecte del tractament per benzilamina i vanadat sobre l'abundància dels transportadors de glucosa en el múscul esquelètic sense que s'observés cap variació en el contingut de GLUT1 o GLUT4 amb els diferents tractaments (figura 16). Aquests resultats no permeten concloure la implicació del múscul esquelètic en la normalització de la glucèmia pel tractament crònic amb benzilamina i vanadat. A l'apartat següent s'amplien els estudis sobre aquest teixit per tal de implicar-lo o descartar-lo en els efectes *in vivo* de la benzilamina i el vanadat.

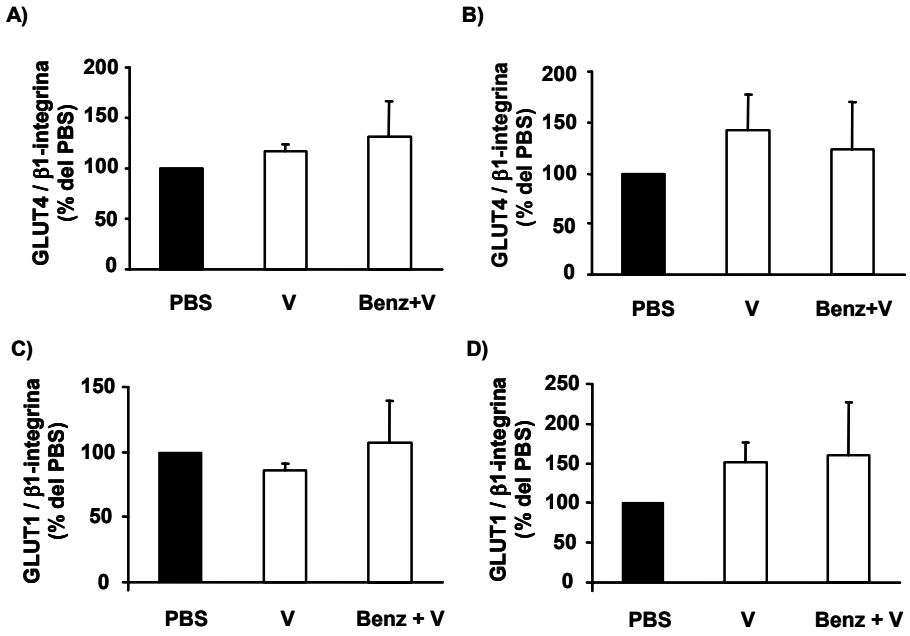


Figura 16. Abundància de GLUT4 i GLUT1 en membranes totals de múscul esquelètic de rates diabètiques. Membranes totals de múscul *soleus* i EDL de rates diabètiques per estreptozotocina tractades durant dues setmanes amb el vehicle (PBS), vanadat (V) o benzilamina i vanadat (Benz + V). Els resultats s'expressen corregits pel control de càrrega β1-integrina i referits al control PBS i són la mitjana ± SE. **A:** abundància de GLUT4 a *soleus* (n = 3). **B:** abundància de GLUT4 a EDL (n = 6). **C:** abundància de GLUT1 a *soleus* (n = 4-6). **D:** abundància de GLUT1 a EDL (n = 4-6).

3. EFECTES DE LA COMBINACIÓ DE BENZILAMINA I VANADAT SOBRE EL METABOLISME DE LA GLUCOSA EN RATES DIABÈTIQUES GOTO-KAKIZAKI

Els resultats d'aquest apartat es recullen a l'**Article 3**:

Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase/Vascular Adhesion Protein -1 Activity Exerts an Antidiabetic Action in Goto-Kakizaki Rats.

Diabetes, 52:1004-1013, 2003

Anna Abella*, Luc Marti*, Marta Camps, Marc Claret, J. Fernández-Álvarez, Ramon Gomis, Anna Gumà, Nathalie Viguerie, Christian Carpéné, Manuel Palacín, Xavier Testar and Antonio Zorzano

* Els dos primers autors comparteixen titularitat.

A continuació vam examinar si la combinació de benzilamina i vanadat presentava efectes insulinomimètics en rates diabètiques Goto-Kakizaki i quins són els mecanismes del metabolisme de la glucosa implicats en els efectes d'aquests compostos.

Les rates Goto-Kakizaki (GK) representen un model de diabetis de tipus 2 no associat a obesitat i que es caracteritza per presentar una hiperglucèmia moderada, hiperinsulinèmia, defectes de secreció d'insulina i resistència perifèrica a la insulina. Els efectes observats en teixits perifèrics inclouen defectes en l'alliberament de glucosa hepàtica i en la captació de glucosa pel múscul i el teixit adipós (Kimura *et al.*, 1982; Kitahara *et al.*, 1978; Krook *et al.*, 1997; Tsuura *et al.*, 1993). Les rates GK provenen de la soca *Wistar* i es van aïllar per selecció dels animals que presentaven una lleugera intolerància a la glucosa (> 10% d'intolerància) i per encreuament dels animals seleccionats (Goto *et al.*, 1976).

3.1. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA EN RATES DIABÈTIQUES GOTO-KAKIZAKI

Les rates Goto-Kakizaki presenten una activitat SSAO a teixit adipós igual a la de les rates no diabètiques (figura 17 A), però una activitat en plasma de gairebé el doble (143 ± 7 i 265 ± 13 pmol/h/ml plasma per a les rates *Wistar* o GK, respectivament) (figura 17 B). L'activitat SSAO augmentada en plasma és característica de l'estat diabètic i s'ha observat en altres models animals de diabetis com per exemple en les rates diabètiques per estreptozotocina (Hayes and Clarke, 1990) i en humans, tant en diabetis de tipus 1 (Boomsma *et al.*, 1995b) com de tipus 2 (Meszaros *et al.*, 1999).

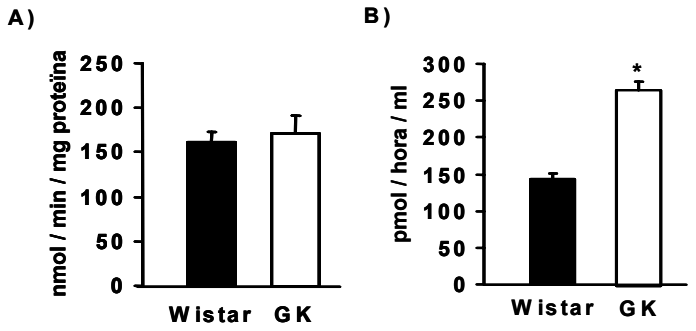


Figura 17. Activitat SSAO en adipòcits i plasma de rates Goto-Kakizaki. **A:** Activitat SSAO a homogenats d'adipòcits aïllats de rates no diabètiques i de rates Goto-Kakizaki, 162 ± 12 i 173 ± 19 nmol/min/mg de proteïna, respectivament. Les dades són la mitjana ± SE de 5 observacions per grup. **B:** Activitat SSAO en plasma assajada com a capacitat d'oxidar benzilamina en plasma de rates no diabètiques (*Wistar*) i en rates diabètiques de tipus 2 (GK) 143 ± 7 i 265 ± 13 pmol/hora/ml de plasma, respectivament. Les dades són la mitjana ± SE de 9-10 observacions per grup. * $p < 0,01$ respecte de les rates no diabètiques.

Les rates Goto-Kakizaki presenten intolerància (> 70%) a la glucosa, deguda tant als defectes en la secreció d'insulina com a la resistència a la insulina dels teixits perifèrics.

Quan es va estudiar la tolerància a la glucosa en aquests animals i es comparà amb la tolerància a la glucosa de rates no diabètiques s'observà que els valors de glucèmia que s'assolien eren molt més elevats. A més a més, mentre que els animals no diabètics tornaven ràpidament a l'estat glucèmic basal, les rates diabètiques necessiten 180 minuts per tornar- hi (figura 1, article 3 i figura 18).

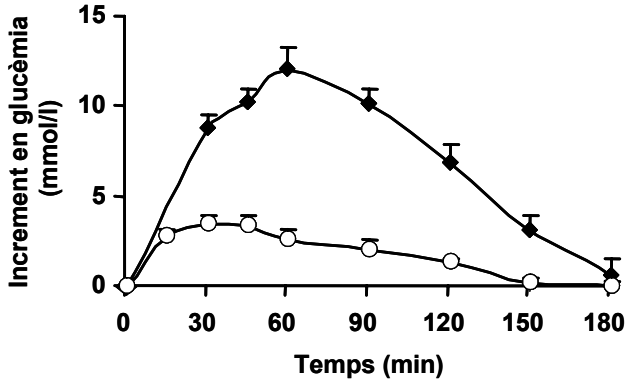


Figura 18. Test de tolerància a la glucosa en rates no diabètiques i en rates diabètiques Goto-Kakizaki. Canvis relatius en la glucèmia després de l'administració oral de glucosa (2g/kg de pes corporal) 15 minuts després d'una injecció intravenosa del vehicle PBS a rates no diabètiques (rodones blanques) o a rates Goto-Kakizaki (rombes negres). Les concentracions de glucosa al temps zero eren de 5,6 ± 0,3 i 11,5 ± 0,4 mmol/l per les rates no diabètiques i diabètiques respectivament. Les dades són la mitjana ± SE de 5-10 observacions per grup.

Quan s'administra benzilamina i vanadat abans de realitzar el test, la tolerància a la glucosa millora de manera dependent de la dosi (30% o 47% segons si la dosi administrada és de benzilamina més 10 μmol/kg o 20 μmol/kg de vanadat, respectivament) (figura 1, article 3 i figura 19). Ni la benzilamina ni cap de les dosis de vanadat usades tenen efectes per si soles (figura 19).

El defecte en la secreció d'insulina que aquests animals presenten fa que aquestes rates siguin un bon model per assajar els efectes de possibles fàrmacs sobre la secreció d'insulina. La secreció d'insulina en resposta a un augment de glucosa circulant és bifàsica; un primer pic apareix ràpidament amb el màxim 30 minuts després de la càrrega oral de glucosa, el segon no comença fins a 90 minuts després. En les rates Goto-Kakizaki no es presenta el primer pic de secreció (Kimura *et al.*, 1982); els mecanismes moleculars implicats no es coneixen. En canvi, els animals que havien rebut la combinació de 7 μmol/kg de benzilamina i 20 μmol/kg de vanadat 15 minuts abans de la càrrega oral de glucosa es va recuperar el primer pic de secreció d'insulina (figura 4, article 3).

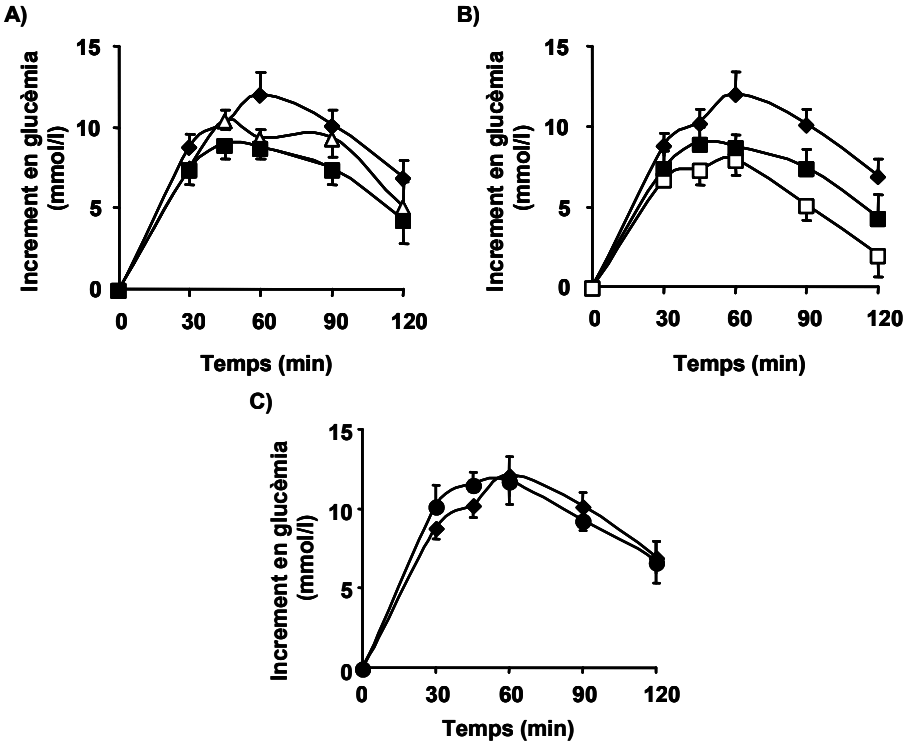


Figura 19. Test de tolerància a la glucosa en rates diabètiques Goto-Kakizaki. Canvis relatius en la glucèmia després d'una carrega oral de glucosa (2 g/kg de pes corporal) al cap de 15 minuts de la injecció intravenosa del vehicle PBS (A, B i C, rombes negres), **A:** 10 μmol/kg vanadat (triangles blancs) o 10 μmol/kg vanadat i 7 μmol/kg benzilamina (quadrats negres). **B:** 10 μmol/kg vanadat i 7 μmol/kg benzilamina (quadrats negres) o 20 μmol/kg vanadat i 7 μmol/kg benzilamina (quadrats blancs). **C:** 7 μmol/kg benzilamina (rodones negres). Les concentracions de glucosa al temps zero eren de 11,5 ± 0,4, 11,8 ± 0,5, 13,1 ± 0,4, 12,4 ± 0,4 i 11,1 ± 0,4 mmol/l en el grup PBS, vanadat 10 μmol/kg, benzilamina i vanadat 10 μmol/kg, benzilamina i vanadat 20 μmol/kg i benzilamina, respectivament. Les dades són la mitjana ± SE de 4-6 observacions per grup.

A fi d'analitzar si els efectes observats *in vivo* eren conseqüència d'un increment en la secreció d'insulina per l'illot pancreàtic en presència de benzilamina i vanadat, es van realitzar estudis de secreció d'insulina amb illots pancreàtics provinents de rates *Wistar* i rates Goto-Kakizaki en condicions de glucosa basals (5,5 mM) o estimuladores de la secreció (16,7 mM) (figura 4, article 3). També es va determinar l'activitat SSAO (taula 4) i l'expressió de la proteïna (figura 4, article 3) en illots pancreàtics i es va observar que els nivells d'activitat presents als illots són unes 300 vegades inferiors que els de teixit adipós.

Taula 4. Activitat SSAO en homogenats d'adipòcits aïllats de rata i en homogenats d'illots pancreàtics de rata. Les dades són la mitjana ± SE de 3 observacions per grup.

	Activitat SSAO a rata
Adipòcits	2,57 ± 0,45 nmol/min/mg proteïna
Illots pancreàtics	8 ± 0,7 pmol/min/mg proteïna

Les rates Goto-Kakizaki presenten una secreció d'insulina disminuïda en comparar-la amb la secreció dels illots de rates no diabètiques (303 ± 46 i 205 ± 24 μU/illot/90 minuts en condicions de glucosa basals i 483 ± 74 i 302 ± 35 μU/illot/90 minuts en condicions

estimuladores de la secreció per a rates *Wistar* i GK, respectivament). En els illots de les rates Goto-Kakizaki s'observà un augment de la secreció d'insulina en condicions de glucosa 16,7 mM quan al medi d'incubació hi havia benzilamina i vanadat. Aquest efecte no s'observà en treballar amb illots de rates *Wistar* (figura 4, article 3). Aquestes dades concorden amb els resultats obtinguts *in vivo*, en què no es van observar diferències pel que fa la insulinèmia durant el test de tolerància a la glucosa en rates *Wistar* prèviament tractades amb benzilamina i vanadat (figura 2) però sí en el cas de les rates Goto-Kakizaki (figura 4, article 3).

3.2. TRACTAMENT CRÒNIC AMB BENZILAMINA I VANADAT DE RATES DIABÈTIQUES GOTO-KAKIZAKI

El tractament crònic de rates Goto-Kakizaki amb 84 μmol/kg/dia de benzilamina i 25 μmol/kg/dia de vanadat va provocar una normalització en la glucèmia dels animals una setmana després d'haver iniciat el tractament. L'administració de vanadat i benzilamina sols no va modificar la glucèmia dels animals (figura 2, article 3 i figura 20).

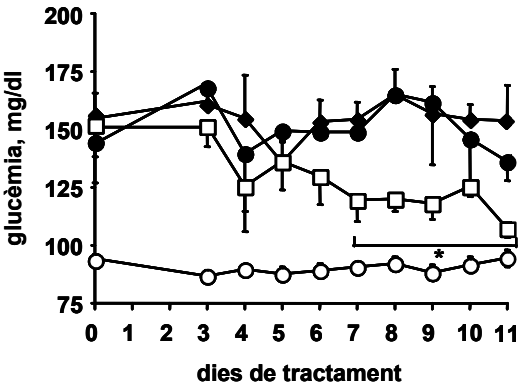


Figura 20. Efecte del tractament crònic amb benzilamina sobre la glucèmia d'animals diabètics Goto-Kakizaki. Es determinà la glucèmia diàriament en animals diabètics control (rombes negres), en animals que havien rebut 84 μmol/kg/dia de benzilamina per mitjà de la bomba implantada (rodones negres) i en animals que havien rebut benzilamina i 25 μmol/kg de vanadat per una injecció intraperitoneal diària (quadrats blancs); també es seguia la glucèmia d'animals no diabètics (rodones blanques). Els resultats són la mitjana ± SE de 5-6 observacions per grup.

Les rates Goto-Kakizaki són hiperinsulinèmiques. En condicions basals els valors d'insulina circulants que presenten estan al voltant de 3 ng/ml; en canvi, els animals no diabètics presenten insulinèmies al voltant d'1 ng/ml. Durant el tractament crònic amb benzilamina i vanadat els valors d'insulina circulants no es van modificar (taula 5). L'absència de canvis en els nivells circulants d'insulina en paral·lel a la millora en la glucèmia ens indica que podem estar davant d'un procés de sensibilització a la insulina en els teixits perifèrics. En el cas del grup que havia rebut vanadat es va observar una reducció en la insulinèmia dels animals; aquesta, però, no es correlaciona amb la glucèmia, ja que els animals que havien rebut només vanadat es mantingueren hiperglucèmics.

Taula 5. Concentracions d'insulina en plasma de rates no diabètiques i rates diabètiques Goto-Kakizaki abans i després del tractament crònic amb benzilamina i vanadat. Les dades són la mitjana ± SE de 4-5 observacions per grup. * $p < 0,05$ indica diferències entre la insulina a l'inici i al final del tractament.

Insulina (ng/ml)

GK	dia 0	dia 14
PBS	2,35 ± 0,51	3,81 ± 1,00
Benzilamina	3,37 ± 0,96	3,84 ± 0,23
Vanadat	3,86 ± 0,13	1,47 ± 0,18 *
Benzilamina + Vanadat	2,58 ± 0,71	2,11 ± 0,8
No diabètics	1,10 ± 0,30	

3.3. METABOLISME GLUCÍDIC EN ELS TEIXITS PERIFÈRICS DESPRÉS DEL TRACTAMENT CRÒNIC AMB BENZILAMINA I VANADAT

En aquest model també es va analitzar el metabolisme glucídic en el teixit adipós i el múscul esquelètic després del tractament crònic a fi de determinar si hi havia canvis que poguessin explicar els efectes sobre la glucèmia observats *in vivo*.

La diabetis de tipus 2 de les rates Goto-Kakizaki no es troba associada a obesitat i, de fet, els animals presenten una disminució en la quantitat de teixit adipós epididimal. El tractament crònic amb benzilamina i vanadat no va afectar la massa de teixit adipós epididimal (figura 21).

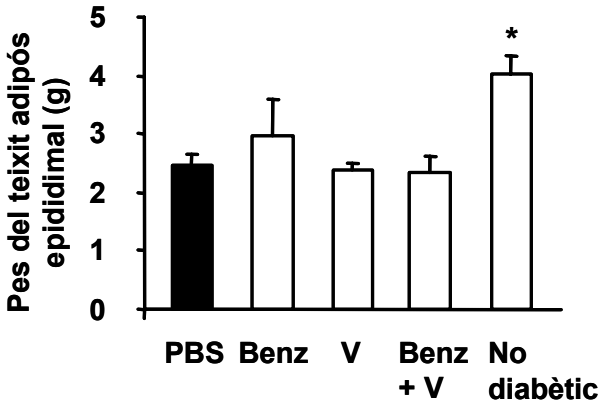


Figura 21. Efecte del tractament crònic amb benzilamina i vanadat sobre el pes del teixit adipós epididimal de rates diabètiques Goto-Kakizaki. Un cop finalitzat el tractament crònic de les rates diabètiques 2 es va extreure el teixit adipós epididimal i se'n determinar el seu pes. Els resultats es presenten com a pes absolut del teixit i són la mitjana ± SE de 5 observacions per grup. * $p < 0,05$ respecte de les diabètiques que han rebut el vehicle PBS.

El transport de glucosa estimulat per 100 nM insulina en adipòcits aïllats de rates Goto-Kakizaki no presenta diferències significatives amb el transport d'adipòcits de rates no diabètiques; s'observa, però, una tendència cap a la resistència (1,52 ± 0,25 i 1,09 ± 0,2 nmol 2DG / 5 min / 100 mg lípids per a les rates *Wistar* i GK, respectivament). La resistència a la insulina del teixit adipós es va posar de manifest en incubar els adipòcits amb 2,5 nM d'insulina (1,28 ± 0,23 i 0,78 ± 0,16 nmol 2DG / 5 min / 100 mg lípids per a les rates *Wistar* i GK, respectivament) (figura 22 A). Així doncs, tot i presentar-se resistència a la insulina en teixit adipós aquesta només s'observa en treballar amb concentracions submàximes d'insulina. Aquest resultat suggereix que la hiperinsulinèmia que presenten els animals encara pot compensar la resistència perifèrica a la insulina; de fet, aquests animals presenten una hiperglucèmia moderada (150 ± 6 mg/dl en front dels 90 ± 2 mg/dl de les rates no diabètiques), si es compara amb la hiperglucèmia (400-500 mg/dl) i la resistència perifèrica acusada que presenten les rates diabètiques per estreptozotocina.

Tal com passava en el cas de la diabetis per estreptozotocina quan es van incubar els adipòcits de rates *Wistar* o Goto-Kakizaki amb la combinació de benzilamina i vanadat l'estimulació del transports de glucosa obtinguda va ser equivalent (1,16 ± 0,09 i 0,93 ± 0,17 nmol 2DG / 5 min / 100 mg lípids en rates *Wistar* i GK, respectivament); a més a més, en el cas de les rates GK aquesta es va acostar al 100% de l'efecte màxim de la insulina (1,09 ± 0,2 nmol 2DG / 5 min / 100 mg lípids) (figura 22 A).

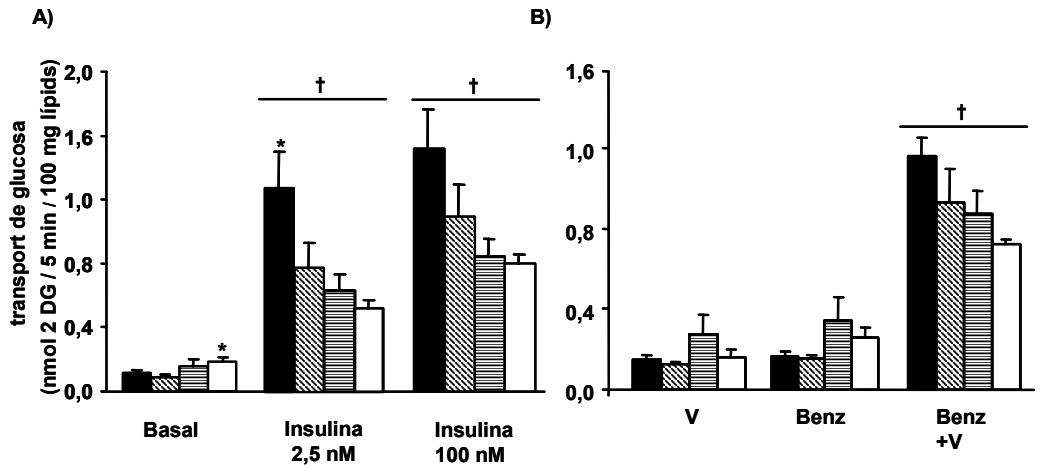


Figura 22. Transport de glucosa a adipòcits aïllats de rates no diabètiques i rates Goto-Kakizaki després del tractament crònic. Es van aïllar adipòcits de rates no diabètiques (■) o de rates diabètiques tractades durant dues setmanes amb el vehicle PBS (▨), 25 μmol/kg/dia vanadat (▤) o la combinació de 84 μmol/kg/dia benzilamina i vanadat (□) i es realitzà el transport de glucosa **A:** en condicions basals i en presència de 100 o 2,5 nM insulina i **B:** en presència de 100 μM vanadat, 100 μM benzilamina o la combinació de vanadat i benzilamina. * $p < 0,05$ indica diferències amb el grup de rates diabètiques que han rebut PBS. † $p < 0,05$ indica diferències amb el transport basal corresponent de cada grup. Les dades són la mitjana ± SE de 4-6 observacions per grup.

El transport basal en adipòcits aïllats de rates diabètiques que havien estat tractades amb benzilamina i vanadat havia augmentat (figura 22 B); aquest efecte sobre el transport basal també s'havia observat en rates diabètiques per estreptozotocina. Quan s'analitzà el

transport de glucosa estimulat per insulina, en canvi, no s'observà cap millora, ni tampoc en el transport estimulat per benzilamina, vanadat o la combinació de tots dos. Així doncs, en aquest cas no es produeix la sensibilització dels adipòcits a causa del tractament amb benzilamina i vanadat que s'observava en el cas de les rates diabètiques per estreptozotocina.

L'abundància de transportadors de glucosa GLUT1 i GLUT4 i la d'SSAO a membranes totals d'adipòcits de rates Goto-Kakizaki és la mateixa que en les rates no diabètiques (Kanoh *et al.*, 2000) (figura 2 B, article 3 i figura 23). L'absència de modificacions en la quantitat d'SSAO es correlaciona amb una activitat enzimàtica semblant en rates *Wistar* i GK (figura 17). El tractament crònic amb benzilamina i vanadat no modificà la quantitat de transportadors de glucosa ni d'SSAO a membranes totals d'adipòcits (figura 23).

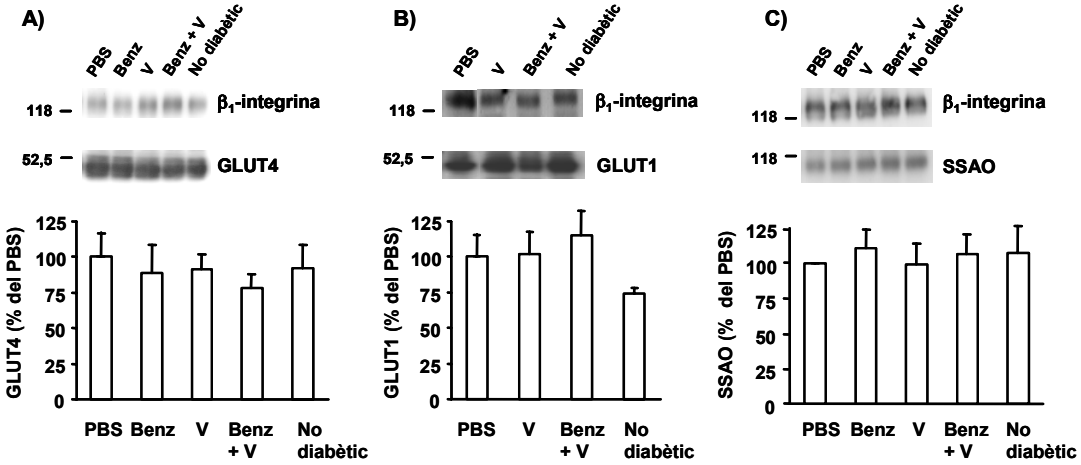


Figura 23. Abundància dels transportadors de glucosa GLUT4 (A) i GLUT1 (B) i de la SSAO (C) en adipòcits aïllats de rates diabètiques. Es van aïllar adipòcits de teixit adipós procedent de rates tractades crònicament amb PBS, vanadat, benzilamina i benzilamina i vanadat i de rates no diabètiques i es mesurà l'abundància de GLUT4, GLUT1 i SSAO present en membranes totals d'aquests adipòcits. Els resultats són la mitjana ± SE de 5 observacions per grup. Es mostra un revelat representatiu per cadascuna de les proteïnes.

En canvi, en condicions basals s'observà un augment del nombre de transportadors GLUT4 a la membrana plasmàtica dels adipòcits d'aquelles rates que havien estat tractades amb benzilamina i vanadat durant dues setmanes (figura 2 C, article 3). Així doncs, tot i que la quantitat total de GLUT4 en adipòcits era la mateixa en animals diabètics tractats o no, la quantitat d'aquest GLUT4 que es trobava a la membrana plasmàtica i, per tant que era actiu per al transport, era major en els animals que havien rebut la combinació dels fàrmacs. En aquells animals on s'havia administrat la benzilamina o el vanadat per separat no s'observaren augments de GLUT4 a la membrana plasmàtica. En estimular els adipòcits amb insulina, i per tant la població de GLUT4 que es troba en vesícules intracel·lulars es desplaça a la membrana, no s'observaren diferències amb relació al tractament.

L'augment, en situació basal, de GLUT4 a la membrana plasmàtica pot explicar l'augment del transport basal i aquest pot contribuir a la millora de la glucèmia observada *in*

vivo. De fet, hi ha una correlació entre la quantitat de GLUT4 present a la membrana plasmàtica en situació basal i el transport basal de glucosa (figura 2 C, article 3).

S'han descrit alteracions en la cascada de senyalització intracel·lular de la insulina a les rates Goto-Kakizaki les quals han estat relacionades amb la resistència perifèrica a la insulina. En aquest sentit, s'ha descrit una baixa fosforilació dels substrats del receptor de la insulina (IRS) i una baixa activitat fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) després de l'acció de la insulina (Begum and Ragolia, 1998; Kanoh *et al.*, 2000). Per analitzar els possibles efectes del tractament amb benzilamina i vanadat sobre l'associació dels IRS i la PI3K es van incubar adipòcits aïllats de rates diabètiques tractades en absència o presència de 100 nM insulina, es van immunoprecipitar homogenats totals dels adipòcits amb un anticòs contra la subunitat p85 de la PI3K i es va mirar les proteïnes fosforilades en tirosines presents a l'immunoprecipitat per transferència *Western blot*. S'observà un augment de la quantitat d'IRS-1 unit a p85 (subunitat reguladora de la PI3K) tant en condicions basals com després de l'estimulació amb insulina en les rates que havien estat tractades amb la combinació dels fàrmacs (figura 24). L'augment de l'associació entre IRS1 i PI3K en condicions basals pot estar implicada en la major presència de GLUT4 a la membrana plasmàtica.

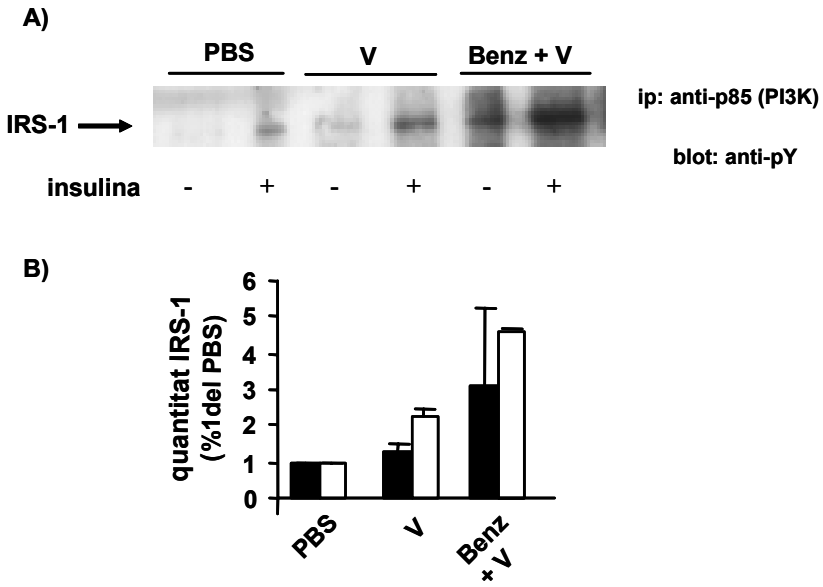


Figura 24. El tractament crònic amb benzilamina i vanadat augmenta l'associació de IRS-1 i p85 en rates Goto-Kakizaki. Es van aïllar adipòcits de rates diabètiques que havien rebut PBS o havien estat tractades crònicament amb vanadat o benzilamina i vanadat, s'incubaren en condicions basals (barres negres) o en presència d'insulina (barres blanques) i es prepararen extractes totals. S'immunoprecipitaren els extractes usant un anticòs contra la subunitat reguladora (p85) de la PI3K (fosfo inositol-3-kinasa). Es carregà l'immunoprecipitat en una transferència *Western blot* i es revelà amb anticòs anti tirosines fosforilades. Els valors són la mitjana ± SE de 3 observacions per grup. **A:** Es mostra un revelat representatiu. **B:** quantificació respecte el grup PBS.

Es va analitzar també l'estat metabòlic del múscul *soleus* de les rates tractades crònicament. La quantitat de GLUT1 i GLUT4 a múscul *soleus* és la mateixa en rates Goto-Kakizaki i en rates *Wistar* (figura 25). El tractament amb vanadat o amb benzilamina i

vanadat, en canvi, va augmentar la quantitat total de GLUT1 a membranes totals de múscul *soleus* (figura 25). En analitzar el transport basal de glucosa a múscul *soleus* de les rates tractades no s'observaren diferències amb relació al transport de les rates no tractades (figura 2 D, article 3). GLUT1 normalment es troba localitzat a la membrana plasmàtica de la cèl·lula i és, en aquesta localització, on realitza el transport de glucosa. L'augment de GLUT1 observat en membranes totals no es correlaciona amb un augment en el transport basal, la qual cosa suggereix que aquest GLUT1 podria no estar actiu o no trobar-se a la membrana plasmàtica.

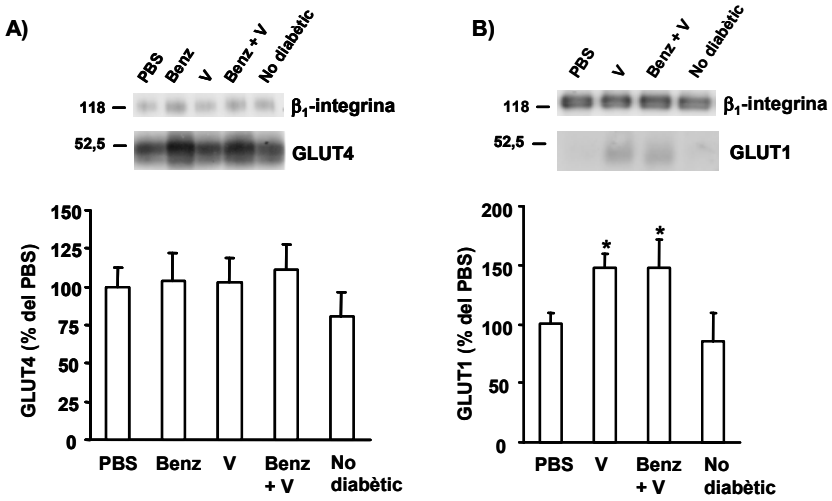


Figura 25. Abundància dels transportadors de glucosa GLUT4 (A) i GLUT1 (B) en múscul soleus de rates diabètiques. Es va aïllar el soleus de rates no diabètiques i de rates diabètiques que havien rebut el vehicle PBS o tractades crònicament amb benzilamina, vanadat o benzilamina i vanadat, es prepararen membranes totals i es mesurà l'abundància de GLUT 4 i GLUT1 per transferència *Western blot*. Els resultats són la mitjana ± SE de 4-5 observacions per grup. Es mostra un revelat representatiu per cadascuna de les proteïnes.

El múscul esquelètic de rates Goto-Kakizaki presenta una clara resistència a la insulina (Song *et al.*, 1999) (figura 2 D, article 3). Quan s'analitzà el transport de glucosa en múscul *soleus* de rates que havien estat tractades amb la combinació de benzilamina i vanadat durant dues setmanes s'observà una reversió d'aquesta resistència. Hi ha una correlació entre el transport estimulat per insulina i la glucèmia que els animals presenten al final del tractament; així, els animals que tenen glucèmies més baixes presenten un transport estimulat per insulina més elevat (figura 26). Es aquest cas, si fem la comparació amb les rates diabètiques per estreptozotocina, estem davant un model de diabetis on hi ha insulina circulant, de manera que aquesta sensibilització a la insulina present al múscul que, com ja s'ha comentat, és un dels teixits que utilitza més glucosa en estat absortiu (DeFronzo *et al.*, 1981), pot ser molt important per aconseguir la normalització glucídica observada *in vivo*.

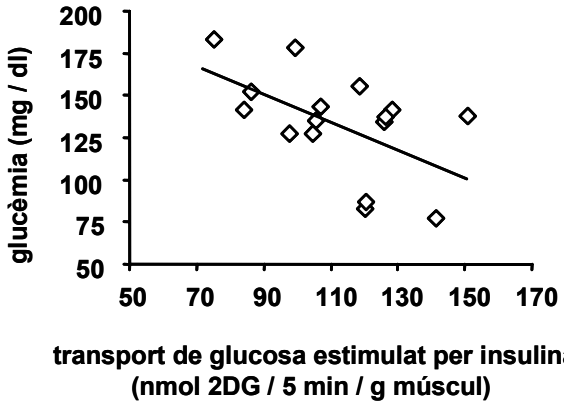


Figura 26. Correlació entre el transport estimulat per insulina al múscul i la glucèmia al final del tractament crònic. Després de dues setmanes de tractament, es van aïllar strips de múscul soleus de rates no diabètiques i de rates diabètiques que havien rebut PBS, o havien estat tractades amb vanadat o amb la combinació de benzilamina i vanadat. Es van incubar els *strips* durant 45 minuts amb 100 nM d'insulina i es mesurà el transport de 2-deoxi-glucosa durant 20 minuts. La correlació és estadísticament significativa, r = 0,55, $p < 0,05$.

3.4. EFECTES DE LA BENZILAMINA I EL VANADAT SOBRE EL METABOLISME MUSCULAR I L'EXPRESSIÓ D'ADIPOCITOCINES

Quan s'administra de manera aguda insulina a un animal, se n'extreu el múscul *soleus* i s'assaja el transport de glucosa, s'observa una estimulació del transport en fer la comparació amb músculs provinents d'animals controls (figura 3, article 3). Es va voler veure si l'administració de benzilamina i vanadat de manera aguda també estimulava el transport de glucosa en múscul *soleus ex vivo*. Així, en aïllar múscul *soleus* de rates que havien rebut una injecció intravenosa de benzilamina i vanadat 25 minuts abans de l'extracció, s'observà que el transport de glucosa es trobava estimulat (figura 3 A, article 3). Aquests efectes depenen de l'activitat SSAO ja que en animals prèviament tractats amb semicarbazida desapareixen els efectes observats (0,77 ± 0,01 ràtio respecte del transport basal). Tant aquests efectes com els canvis en el metabolisme glucídic del múscul observats en les rates Goto-Kakizaki tractades crònicament amb benzilamina i vanadat no es poden explicar per acció directa de la combinació de benzilamina i vanadat sobre múscul atès que la presència d'SSAO és inexistent o molt baixa en aquest teixit (taula 3).

En aquest senti, s'ha descrit recentment que la cèl·lula adiposa regula la sensibilitat a la insulina en altres teixits, com per exemple el múscul, mitjançant la secreció d'adipocitocines (revisat a Steppan and Lazar, 2002) (figura 27). Així doncs, ens vam plantejar la possibilitat que la benzilamina i el vanadat produïssin canvis en l'expressió gènica de les adipocitocines. A tal efecte, vam estudiar els nivells d'RNA missatger (RNAm) corresponents a leptina, TNFα, adiponectina i resistina.

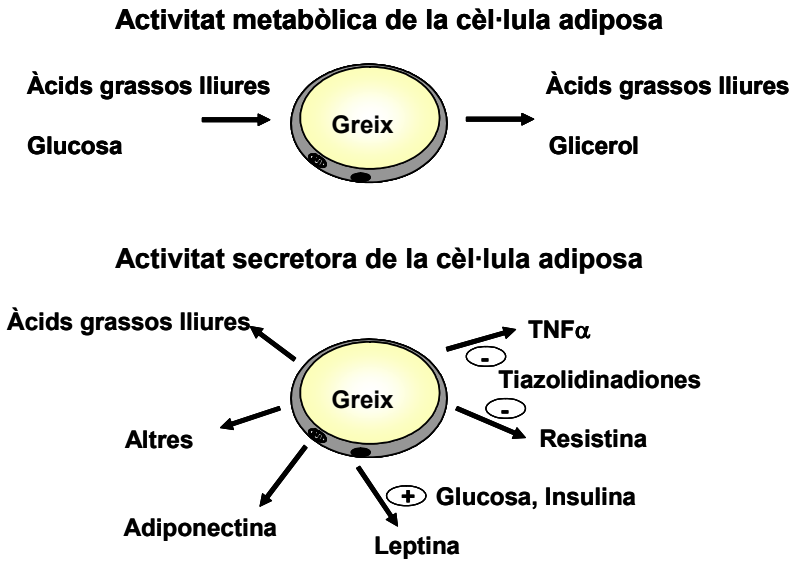


Figura 27. Activitat metabòlica i secretora de la cèl·lula adiposa.

Per determinar els nivells d'adipocitocines al teixit adipós després del tractament crònic és va preparar RNA total de teixit adipós, es va retrotranscriure l'RNAm i el cDNA obtingut es va analitzar per PCR en temps real (figura 28).

De les adipocitocines estudiades les rates diabètiques Goto-Kakizaki tenen alteracions en la leptina i la resistina, mentre que l'adiponectina i el TNFα no es veuen modificades amb la diabetis (figura 28). La leptina està augmentada. Aquesta hormona està implicada en la regulació de la ingesta, de manera que augmenta en ingerir aliments per tal que es produeixi la sensació de sacietat; la insulina augmenta la seva expressió (Saladin *et al.*, 1995). En aquests animals hi ha hiperinsulinèmia de manera que és lògic l'augment observat en la leptina. En el cas de la resistina, hi ha una disminució de la seva expressió associada a la diabetis de les rates Goto-Kakizaki. El paper d'aquesta hormona no està gaire clar i s'han descrit tant augments com davallades de la seva expressió associats a l'estat diabètic i a situacions de resistència a la insulina (revisat a la introducció, punt 1.2.4). En el nostre cas, les dades obtingudes concorden amb els estudis que descriuen una davallada de la seva expressió durant estats de resistència a la insulina.

El tractament crònic amb vanadat o benzilamina i vanadat va provocar una disminució de l'expressió de la leptina i l'adiponectina i no va modificar els nivells d'expressió de la resistina i el TNFα (figura 28). Es podria pensar que la disminució de l'expressió de leptina observada pot ser una conseqüència de la normalització de la hiperinsulinèmia que els animals presenten; en el nostre cas, però, la disminució observada en les rates que havien estat tractades amb benzilamina i vanadat no es correlaciona amb un canvi en la

hiperinsulinèmia dels animals, ja que, com ja s'ha comentat, els animals es mantenen hiperinsulinèmics. En alguns tractaments amb fàrmacs antidiabètics com les tiazolidinediones s'ha descrit una disminució de l'expressió de la leptina (Ahima and Flier, 2000); també hi ha diversos estudis sobre els efectes del vanadat en l'expressió de leptina. Alguns autors han descrit disminucions de la seva expressió en incubar explants de teixit adipós de ratolí amb vanadat (Suenaga *et al.*, 2001), mentre que altres han descrit augments en incubar adipòcits aïllats de rata amb vanadat (Wang *et al.*, 2002); pel que fa a administracions *in vivo* s'ha descrit que dosis de vanadat que produeixen normoglucèmia en rates diabètiques per estreptozotocina augmenten els nivells de leptina en plasma (Chen *et al.*, 2001). En el nostre cas, les concentracions de vanadat usades no eren hipoglucemiants per elles mateixes i de fet s'observà una disminució de l'expressió de leptina tant en les rates tractades només amb vanadat, com en les que havien rebut la combinació de benzilamina i vanadat, les quals sí que havien normalitzat la seva glucèmia. No s'observà per tant, correlació entre l'expressió de leptina i la glucèmia dels animals.

Una altra adipocitocina afectada pel tractament amb benzilamina i vanadat va ser l'adiponectina, els seus nivells disminueixen amb el tractament crònic amb vanadat i amb benzilamina i vanadat (figura 28). Aquests resultats són difícils d'explicar ja que aquesta adipocitocina està relacionada amb la sensibilitat a la insulina. Així doncs, el que s'esperava era un augment de la seva expressió amb el tractament amb benzilamina i vanadat que, com s'ha vist, millora la sensibilitat a la insulina en múscul (figura 2 D, article 3). En aquest cas, per tant, tampoc no s'observà una correlació entre l'expressió d'adiponectina i l'estat glucèmic de les rates Goto-Kakizaki.

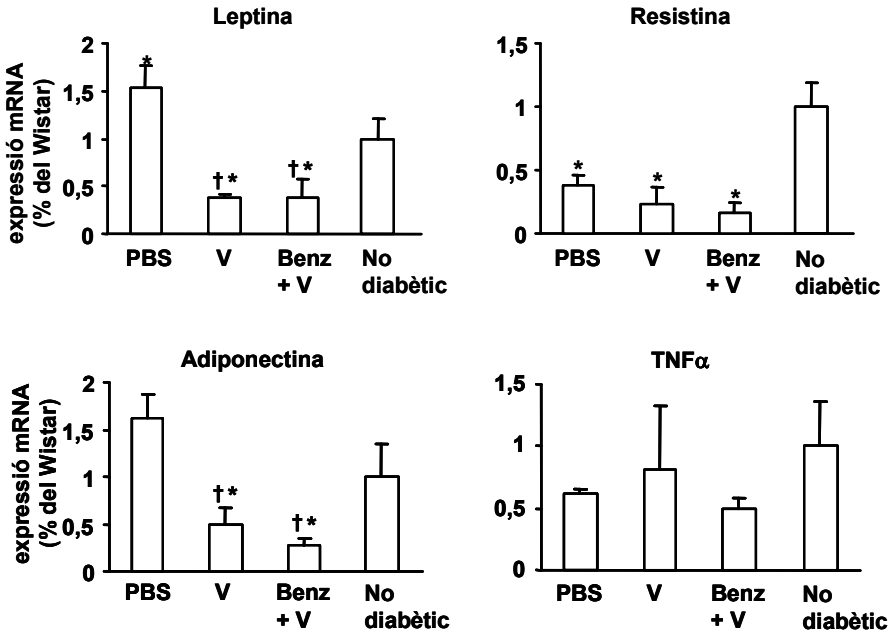


Figura 28. Efecte dels tractaments crònics en el nivell expressió d'RNA missatger d'adipocitocines al teixit adipós. Analitzat per PCR en temps real. * $p < 0,05$ respecte del grup no diabètic † $p < 0,05$ respecte el grup diabètic PBS. TNFα: factor de necrosi tumoral alfa.

A causa de l'absència de canvis de l'expressió de resistina amb el tractament, descartem també el paper d'aquesta adipocitocina en la normalització de la glucèmia observada. Pel que fa al TNFα, tot i que se l'ha implicat en la resistènica a la insulina al múscul i el teixit adipós (vegeu el punt 1.2.2. de la introducció) en les rates Goto-Kakizaki no sembla està implicat ja que, a banda de no modificar-se amb la diabetis, no es modifica amb el tractament (figura 28).

Després de descartar el paper de les adipocitocines en la millora de la sensibilitat a la insulina en múscul i a fi de comprovar si la millora observada en la resistència a la insulina en múscul era causada per una reducció en els nivells d'àcids grassos circulants, es va determinar la quantitat d'àcids grassos lliures o no esterificats (FFA o NEFA) i la de triglicèrids en plasma de rates diabètiques després del tractament crònic. La sensibilitat a la insulina en múscul està afectada pels nivells d'àcids grassos circulants; en obesitat i diabetis de tipus 2 aquests augments escorrelacionen amb la resistència a la insulina observada en múscul (Boden *et al.*, 1994; Reaven *et al.*, 1988). En el cas dels àcids grassos lliures no es van observar diferències ni amb la diabetis ni amb els tractaments (figura 29 A). En el cas dels triglicèrids, en canvi, s'observà un augment dels nivells circulants amb la diabetis; aquests nivells, però, no van disminuir amb el tractament (figura 29 B).

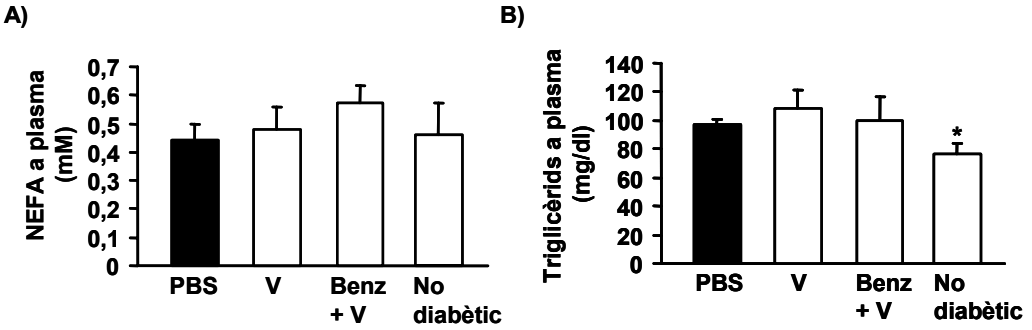


Figura 29. Efecte dels tractaments crònics sobre l'alliberament d'àcids grassos lliures (A) (FFA o NEFA) o triglicèrids (B) pel teixit adipós. La quantificació dels nivells circulants es fa per mitjà de kits comercials a partir de plasma preparat de rates no diabètiques o de rates diabètiques que han estat tractades durant dues setmanes al final del tractament. Els resultats són la mitjana ± SE de 5 observacions per grup. * $p < 0,05$ respecte el grup PBS.

Sembla, doncs, que els efectes observats sobre múscul després de l'administració de benzilamina i vanadat no són conseqüència de canvis ni en l'expressió de gens que codifiquen per les adipocitocines estudiades ni en les concentracions d'àcids grassos lliures.

Malgrat aquests resultats i atesa la creixent importància del teixit adipós en la resistència a la insulina global a l'organisme (Abel *et al.*, 2001), es van coincubar músculs *soleus* amb explants de teixit adipós amb la finalitat de determinar la possible implicació del teixit adipós en la millora de la sensibilitat insulínica del múscul. Quan es van incubar músculs *soleus* en presència de benzilamina i vanadat no s'obtingué cap estimulació del transport, però si en el medi d'incubació hi havia teixit adipós s'obtingueren estimulacions

del transport de glucosa del 70% de l'efecte màxim de a la insulina. La presència de teixit adipós sol no afectà el transport de glucosa a múscul tant en absència com en presència d'insulina (figura 3 B, article 3 i figura 30). Els efectes observats són depenen de l'activitat SSAO present en teixit adipós ja que el transport de glucosa no es va veure estimulat quan es va inhibir amb semicarbazida.

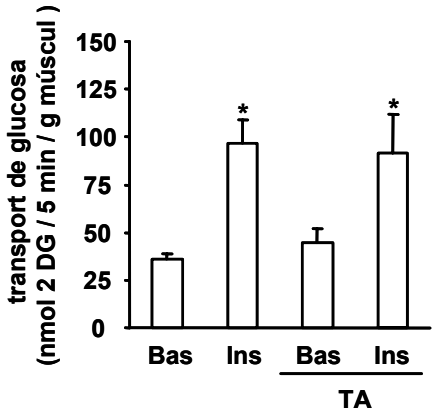


Figura 30. Efectes del teixit adipós sobre el transport estimulat per insulina al múscul soleus. Es van incubar músculs soleus durant 30 minuts en absència (Bas) o presència (Ins) de 100 nM d'insulina i amb o sense 300 mg de teixit adipós epididimal. Es realitzà el transport de 2-deoxi-glucosa durant 5 minuts. Els valors són la mitjana ± SE de 3-4 observacions per grup. * $p < 0,05$ si es compara amb el basal respectiu.

En un següent pas, es va voler veure si els efectes estimuladors sobre múscul requerien la totalitat de la cèl·lula adiposa o només l'activitat SSAO; així doncs, es van incubar músculs *soleus* en presència de benzilamina i vanadat i SSAO recombinat humana. El transport de glucosa obtingut en aquest cas va ser comparable a l'obtingut en estimular el múscul amb insulina (figura 3 C, article 3); aquests resultats indiquen que els efectes observats en múscul esquelètic requereixen tan sols l'activitat SSAO.

Tots aquests resultats ens permeten concloure que l'estimulació del transport de glucosa a múscul esquelètic *in vivo* observada ens els animals tractats crònicament amb benzilamina i vanadat està produïda per senyals que depenen de l'activitat SSAO, presumiblement originats al teixit adipós de manera ràpida.

3.5. IMPLICACIÓ DE LES PROTEÏNA TIROSINA-FOSFATASA I PRODUCCIÓ DE PEROXOVANADAT EN LA VIA ESTIMULADA PER BENZILAMINA I VANADAT

La producció de peròxid d'hidrogen per l'acció de l'activitat SSAO és necessària per a l'estimulació del transport de glucosa i el reclutament de GLUT4 a la membrana plasmàtica observats *in vitro* (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998). Així doncs, és factible pensar que el peròxid d'hidrogen format en combinació amb el vanadat administrat podria formar peroxovanadat, un potent agent insulinomimètic (Fantus *et al.*, 1989), i que sigui aquest el responsable dels efectes sobre el metabolisme de la glucosa observats *in vivo*.

A fi d'obtenir evidència de la possible generació de peroxovanadat en adipòcits per la combinació de benzilamina i vanadat en reaccionar amb l'activitat SSAO i basant-nos en el fet que la inhibició de les proteïnes tirosina-fosfatasa (PTP) per part del peroxovanadat és irreversible mentre que la produïda per vanadat és reversible (Huyer *et al.*, 1997), es va assajar l'activitat PTP total i el perfil de fosforilació en proteïnes en extractes d'adipòcits aïllats de rates diabètiques per estreptozotocina tractades crònicament.

L'activitat PTP es va assajar en absència o presència d'EDTA 1 mM; l'EDTA és un quelant de vanadat de manera que reverteix la seva acció inhibitòria sobre les PTP (figura 31 A). L'activitat assajada en extractes d'adipòcits de rates diabètiques per estreptozotocina control o tractades crònicament amb vanadat o la combinació de vanadat i benzilamina així

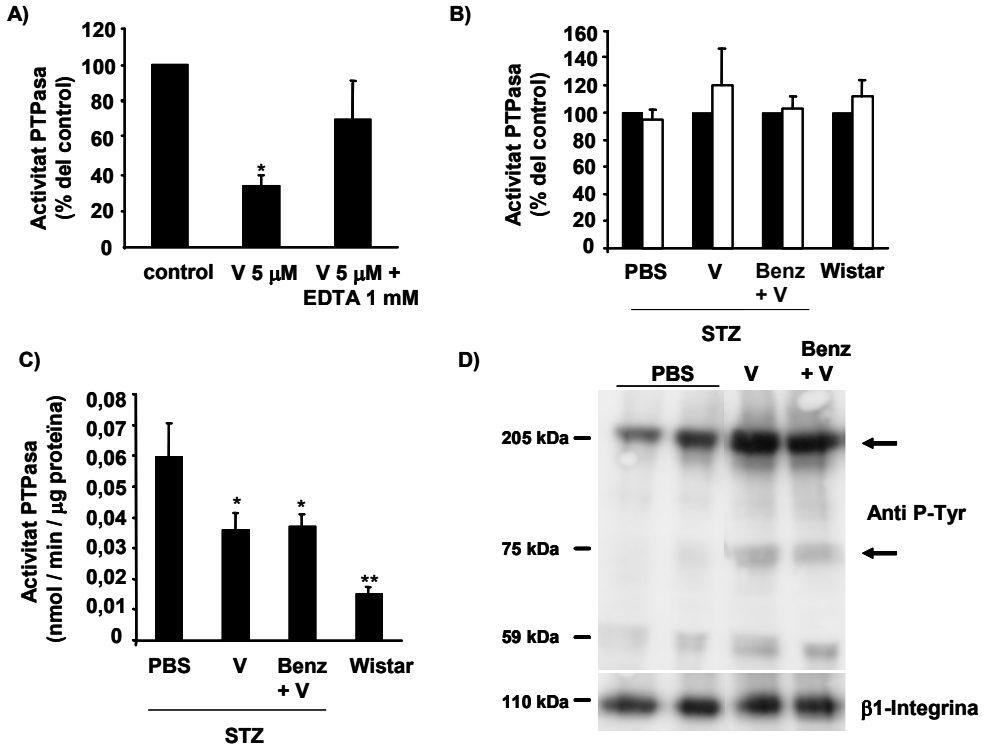


Figura 31. Activitat PTP i nivell de fosforilació en homogenats de teixit adipós. A: Activitat PTP d'homogenats de teixit adipós de rates *Wistar* assajat en presència de 5 mM vanadat i/o 1 mM EDTA. Els resultats estan expressats com activitats residuals en front dels valors control i són la mitjana ± SE de 3 observacions, * $p < 0,05$ respecte del control. **B:** Activitat PTP d'homogenats de teixit adipós de rates diabètiques (STZ) que havien estat tractades durant dues setmanes amb el vehicle PBS, vanadat (V) o benzilamina i vanadat (Benz + V) i de rates no diabètiques (*Wistar*); s'assajà l'activitat en absència (barres negres) o presència (barres blanques) d'1 mM EDTA. Els resultats s'expressen com a percentatge dels valors control sense EDTA i són la mitjana ± de 4-9 observacions per condició. **C:** Activitat PTP d'homogenats de teixit adipós de rates diabètiques (STZ) no tractades (PBS), o tractades amb vanadat (V) o benzilamina i vanadat (Benz + V) i de rates no diabètiques (*Wistar*). Els resultats s'expressen en nmol/min/μg proteïna i són la mitjana ± SE de 4-18 observacions. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecte del grup diabètic no tractat. **D:** Nivell de fosforilació en homogenats totals de teixit adipós de rates diabètiques no tractades (PBS) o que havien estat tractades durant dues setmanes amb vanadat (V) o benzilamina i vanadat (Benz + V). Es van carregar 100 μg de proteïna dels homogenats en un gel d'acrilamida al 7% i es va revelar la transferència *Western blot* amb un anticòs anti-tirosines fosforilades. Com a control de càrrega s'utilitzà la β1-integrina. Es mostra un revelat representatiu.

com de rates no diabètiques fou similar en absència o presència d'EDTA (figura 31 B); aquest resultat indica que la diferent activitat PTP que mostren els animals diabètics tractats (figura 31 C) no és causada per la presència de vanadat als extractes. La diabetis induïda per estreptozotocina causa un fort augment de l'activitat PTP (Begum *et al.*, 1991) (figura 31 C) i el tractament crònic tant amb vanadat com amb benzilamina i vanadat provoca una reducció significativa de l'activitat PTP. La reducció causada pel vanadat sol o la seva combinació amb benzilamina és similar, no observant-se correlació entre la inhibició de l'activitat PTP, l'activació del transport basal, la inducció de l'expressió de GLUT4 o la reducció de la hiperglucèmia pel tractament crònic. Així mateix, tant el tractament amb vanadat com amb benzilamina i vanadat augmenta d'una manera similar la fosforilació en tirosines de proteïnes presents en extractes totals de teixit adipós (figura 31 D). Aquest resultat no exclou la possibilitat d'una activitat PTP específica responsable dels efectes de benzilamina i vanadat sobre el transport de glucosa que hauria de ser inhibida en un major grau per la combinació de benzilamina i vanadat que per vanadat sol.

Diverses dades i conclusions extretes d'aquests resultats i que es detallen a continuació ens feien pensar que la molècula generada era el peroxovanadat:

1. En les rates STZ tractades crònicament amb benzilamina i vanadat, s'observava un augment en les proteïnes fosforilades en tirosina en homogenats de teixit adipós i una disminució en l'activitat fosfatasa en aquest teixit (figura 31).
2. La incubació d'adipòcits aïllats de rata amb benzilamina i vanadat augmentava la fosforilació en tirosines de manera similar a la causada per la incubació amb peroxovanadat (figura 5 B, article 3)
3. L'activitat proteïna tirosina-fosfatasa en homogenats d'adipòcits incubats amb benzilamina i vanadat o peroxovanadat es trobava disminuïda d'una manera similar (figura 5 C, article 3).
4. La reacció catalitzada per SSAO genera peròxid d'hidrogen, el qual podria reaccionar amb vanadat generant peroxovanadat.
5. El peroxovanadat és un potent estimulador del transport de glucosa en múscul esquelètic (Leighton *et al.*, 1991).

Amb aquesta informació es va utilitzar una aproximació més directa per tal de determinar si efectivament l'activitat SSAO genera peroxovanadat en presència de benzilamina i vanadat; així doncs, va usar la tècnica de ressonància magnètica nuclear (RMN). El vanadat presenta dos pics que es poden detectar per RMN a 560 i 580 ppm, en presència de peròxid d'hidrogen, es genera peroxovanadat que es detecta a 630 ppm (monoperoxovanadat) i a 730 ppm (triperoxovanadat) (figura 5 A, article 3). La incubació de l'SSAO recombinant humana amb benzilamina i vanadat generà espècies de peroxovanadat

que es van detectar a les posicions 630 i 730 ppm. No es van observar aquestes espècies quan s'incubà l'SSAO només amb un dels dos compostos (figura 5 A, article 3 i figura 32).

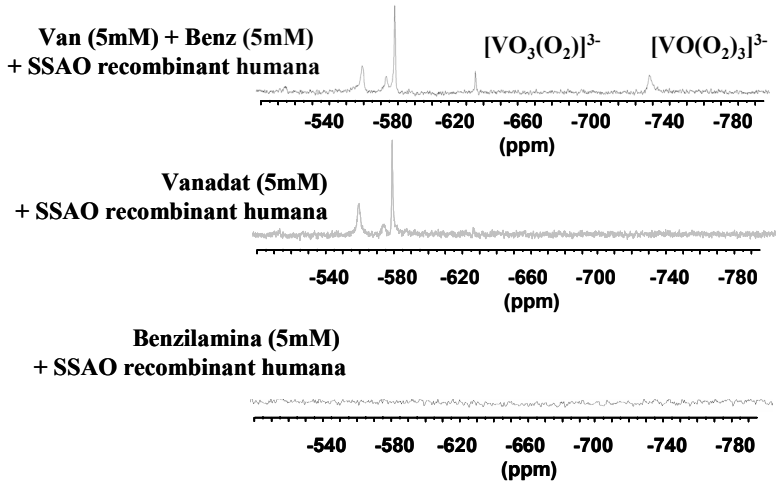


Figura 32. Per a la generació de peroxovanadat cal la presència de vanadat i benzilamina. Identificació de vanadat i compostos de peroxovanadat per ressonància de V51 després de la incubació de la proteïna SSAO recombinant humana amb 1) 5 mM vanadat i 5 mM benzilamina, 2) 5 mM de vanadat sol o 3) 5 mM de benzilamina sola.

Aquests estudis suggereixen que la benzilamina i el vanadat poden generar peroxovanadat, un potent inhibidor de proteïnes tirosina-fosfatasa, en cèl·lules adiposes. Les proteïnes tirosina-fosfatasa estan implicades en la desfosforilació de proteïnes per a l'acabament de la cascada de senyalització de la insulina. Alteracions en l'activitat de les proteïnes tirosina-fosfatasa s'han vist implicades en la resistència a la insulina associada a l'obesitat i la diabetis (Ahmad *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 1995; Ahmad and Goldstein, 1995a; Ahmad and Goldstein, 1995b; Zabolotny *et al.*, 2001). Amb l'administració de benzilamina i vanadat es produeix peroxovanadat, que inhibirà proteïnes tirosina-fosfatasa i farà disminuir, tal com s'ha observat en els models de diabetis estudiats, la resistència a la insulina en els teixits perifèrics.

4. ELS ADIPÒCITS ALLIBEREN UNA FORMA SOLUBLE D'SSAO/VAP-1

Els resultats d'aquest apartat es recullen a l'**Article 4**:

Adipocytes release a soluble form of VAP-1/SSAO by a metalloprotease-dependent process and in a regulated manner

Enviat a *Diabetes*

Anna Abella, Nathalie Viguerie, Anna Ros, Manuel Palacín, Antonio Zorzano and Luc Marti

ADIPOCYTES RELEASE A SOLUBLE FORM OF VAP-1/SSAO BY A METALLOPROTEASE-DEPENDENT PROCESS AND IN A REGULATED MANNER.

Anna Abella, Nathalie Viguerie*, Anna Ros-Baró, Manuel Palacín, Antonio Zorzano and Luc Marti¶.

ABSTRACT

VAP-1/SSAO is a dual function membrane protein with adhesion properties and amine oxidase activity. A soluble form of VAP-1 is detected in serum, where concentrations are enhanced in diabetes, liver inflammation and congestive heart disease. Soluble VAP-1 regulates lymphocyte binding to endothelial cells and the cell types that release soluble VAP-1 are unknown.

Here we examine whether adipose cells, which show abundant expression of VAP-1/SSAO, are a source of soluble VAP-1. Our data indicate that 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue explants release a soluble form of VAP-1/SSAO, which derives from the membrane. The release of soluble VAP-1 was blocked by batimastat, a metalloprotease inhibitor and was enhanced by exposure of adipocytes or adipose tissue explants to TNFα or dibutyryl-cAMP. Partial ablation of adipose tissue in rats reduced plasma SSAO activity. In contrast, diabetic conditions characterized by insulin resistance in adipose tissue were associated with enhanced plasma SSAO activity.

Our data demonstrate that adipose cells are a source of soluble VAP-1/SSAO and that SSAO release is enhanced in conditions of insulin resistance. Based on these data we propose that adipose cells, via release of VAP-1/SSAO, may contribute to atherogenesis and vascular dysfunction, which represent major chronic complications associated with diabetes.

From Barcelona Scientific Parc and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Josep Samitier 1-5, 08028 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-4034700; Fax: 34-93-4034717.
e.mail: lmarti@porthos.bio.ub.es
* Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U 317), IFR 31, C.H.U. Rangueil, 31403 Toulouse Cedex 4, France.
¶ To whom correspondence should be addressed
Key words: Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase, Vascular-Adhesion Protein-1, human adipocytes, matrix-metalloprotease, protein shedding.

Abbreviations: SSAO, semicarbazide-sensitive amine oxidase; VAP-1, vascular adhesion protein-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; TNFα, tumor necrosis factor-α; db-cAMP, dibutyryl- cyclic-adenosine monophosphate; MMP: matrix metalloproteases; SCZ, semicarbazide.

INTRODUCTION

In inflammatory diseases, such as atherosclerosis or diabetes, adhesion molecules are upregulated on the vascular endothelium at inflammation sites and they mediate a multistep adhesive process leading to the transmigration of leukocytes from the circulation into inflammed tissues (1,2).

In addition to membrane-bound adhesion molecules, soluble isoforms have been detected in the plasma of healthy individuals (3-5). Increased concentrations of such soluble adhesion molecules have been associated with atherosclerosis (3,6,7), type I diabetes (8-10), type II diabetes (11-13), hypertension (6), hyperlipidaemia (14) and cardiovascular diseases (15,16). The levels of soluble adhesion molecules in blood may simply reflect endothelial inflammation/activation and increased expression on the endothelial surface. However, these soluble adhesion molecules also fulfill a biological role by mediating angiogenesis (E-selectin, VCAM-1) (17), modulating autoimmune inflammatory reactions that lead to type I diabetes (ICAM-1) (10,17), stimulating endothelial cell migration (sVCAM-1, E-selectin) (9) exerting procoagulant activity (P-selectin) (18) or increasing lymphocyte binding (Gly-CAM-1, VAP-1) (4,19). All these events have been implicated in cardiovascular complications such as atherosclerosis, angiopathy or retinopathy (20,21).

Vascular Adhesion Protein-1 (VAP-1)

mediates lymphocyte adhesion to endothelial cells in a sialic acid-dependent manner (22). VAP-1 is identical to Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (SSAO) (EC 1.4.3.6) (23,24). The soluble form of VAP-1/SSAO is found in the serum of healthy adults in the range of 50-140 ng/ml and is enhanced in inflammatory liver diseases (4), cardiovascular pathologies (25), and the endstage of renal disease (26) in type I diabetes (27,28) and type II diabetes (27,29,30). For several reasons, the rise in circulating VAP-1/SSAO may be implicated in cardiovascular complications. The membrane form of VAP-1/SSAO is highly expressed in endothelial cells, smooth muscle cells and adipose cells, which are strongly implicated in the pathology of atherosclerosis. The soluble form of VAP-1/SSAO enhances the binding capacity of lymphocytes to endothelial cells (4) presumably through a lymphocyte preactivation signal. In addition, aldehydes, such as formaldehyde or methylglyoxal, products of the reaction catalysed by SSAO, may generate protein cross-linking or advanced glycosylation end products implicated in atherogenic lesions, retinopathy and angiopathy associated with diabetes.

In diabetes the mechanisms and effectors involved in the shedding of sVAP-1/SSAO are unknown. In chronic liver disease it has been proposed that sVAP-1/SSAO is derived from the liver (31). Based on the central role of adipose tissue in diabetes (32) and the fact that SSAO is highly expressed in adipose tissue at the surface of adipocytes (33-35), our aim was to test whether adipocytes release a soluble form of VAP-1/SSAO in a regulated way. We observed that 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue explants release a functional soluble VAP-1/SSAO protein produced by a matrix metalloprotease-dependent shedding of the membrane form. In addition, we demonstrate that VAP-1 release is enhanced by factors that generate insulin resistance in adipose cells such as TNFα or cAMP analogues. The present study describes the regulated release of VAP-1/SSAO, a protein implicated in inflammation and endothelial injury, from adipose tissue. This finding provides a new link between adipose tissue, inflammation and vascular disease.

MATERIALS AND METHODS

Materials. [^{14}C]Benzylamine (59 Ci/mmol) was from Amersham Pharmacia Biotech (Arlington Heights, IL, USA). Purified porcine insulin was a kind gift from Eli Lilly (Indianapolis, IN). Streptozotocin, semicarbazide hydrochloride, benzylamine hydrochloride and other chemicals were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Murine and human TNFα was from Peprotech (London, UK). Batimastat (BB94) was a kind gift from Joaquin Arribas (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona) and from Alexia Girard (Inserm U317, Toulouse, France). All electrophoresis reagents and molecular-weight markers were obtained from Bio-Rad. Enhanced chemiluminescence reagents (super signal substrate) were from Amersham (Arlington Heights, IL). *Vibrio Cholera* neuraminidase (Sialidase) was is from Boehringer Mannheim. The monoclonal anti-VAP-1/SSAO, TK10-79, was a kind gift from Dr. S. Jalkanen (University of Turku). Polyclonal anti-GLUT4 antibody (OSCRX) was produced from rabbit as previously reported (36). Polyclonal anti-caveolin-1 antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Amicon Centriprep and centricon were from Millipore (Bedford, M, USA).

Animals. Male *Wistar* rats weighing 180-220 g were purchased from Harlan (Interfauna Ibèrica S.A., Spain). Type I diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of a freshly prepared solution of streptozotocin (70 mg/kg body weight dissolved in 50 mM citrate buffer, pH 4.5). Goto-Kakizaki diabetic rats, a model of type 2 diabetes, were purchased from M&B Animal Models (Denmark). The animals were housed in animal quarters at 22º C with a 12 h light / 12 h dark cycle and fed *ad libitum*.
Adipose tissue was ablated by removing the epididymal and perirenal adipose tissue under anaesthesia**.** A group of control animals was sham-operated. Blood was collected from the tail vein every other day for one week and plasma was prepared and stored at –20ºC until use.
All procedures used were approved by the Ethical Committee of the University of Barcelona.

Cell cultures. 3T3-L1fibroblasts from the American Type Culture Collection (Manassas, Va, U.S.A.) were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 25 mM glucose and L-glutamine and supplemented with 10% (v/v) calf serum (Frost and Lane, ref. 21 PNAS A. Ros). At 2 days after confluence (day 0), differentiation was induced with methylisobutylxantine (0.5 mM), dexamethasone (0.25 μM) and insulin (5 μg/ml) in DMEM and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). After 2 days the methylisobutylxantine and dexamethasone were removed and insulin was maintained for a further two days. From day 4 onwards, DMEM and 10% (v/v) FBS were replaced every 2 days. Cells were used for experiments after two weeks of differentiation. In order to eliminate possible contamination by bovine SSAO, 24 h or 48 h before collection of the medium cell monolayers were washed several times in phosphate buffer saline (PBS) and incubated in serum-free DMEM in the presence or absence of the indicated drugs. In the treatment with changes in the glucose concentration used, 4 days before the collection of the medium cells were washed in PBS and cultured in low glucose DMEM containing only 5 mM glucose and 10% (v/v) FBS. After 2 days cells were washed in PBS and maintained in serum-free low glucose

DMEM.
Cultured medium was collected and centrifuged at 200,000xg at 4ºC for 2 h to eliminate dead cells or contamination by membrane ghosts. After centrifugation the supernatant was concentrated using Centriprep and Centricon tubes (Amicon, Millipore). The medium was maintained at 4ºC during the protocol and stored at –80ºC.

Human explants. Subcutaneous abdominal adipose tissue was obtained from patients undergoing dermolipectomy at the Department of Plastic Surgery of Toulouse Rangueil Hospital. All patients had fasted overnight, and the operations were performed in the morning under general anesthesia. The study was approved by the Ethical Committee of Toulouse University Hospital. Surgical samples were dissected out from skin and vessels, rinsed once in warmed PBS and transferred in a sterile environment. The fat pads were cut into small pieces ranging from 100 to 400 mg, distributed into 25 cm^2 polystyrene flasks (Falcon, Becton Dickinson, Meylan, France) containing from 5 to 6 g of adipose tissue, then placed in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin (200U/ml), streptomycin (50µg/ml) and gentamycin (200 µg/ml) and maintained at 37°C in a 7% CO_2 chamber. One day later, the medium was changed to FCS-free DMEM and explants were treated with the indicated drugs or the vehicle. After 48 h of treatment, the media were collected, ultracentrifuged and concentrated as described above.

3T3-L1 adipocyte extracts. Cells were harvested and homogenized in an HES buffer (25 mM Hepes, 2 mM EDTA, 255 mM Sucrose) with antiproteases (1 µM pepstatin, 1 µM leupeptin, 0.14 trypsin inhibitor units (TIU)/ml Aprotinin and 1 mM PMSF). The lysates were then centrifuged at 2000 rpm at 4ºC for 15 min to eliminate the fat cake, and supernatants were collected and stored at –80ºC. Protein concentrations were determined by the Bradford method (Anal. Biochem 1976) with γ-globulin as a standard.

Sialidase and N-glycosidase treatments. 100 µl of concentrated culture medium or 20 µg of adipocyte extract was incubated with Vibrio cholerae sialidase (10 mU, 2 h, 37°C), which removes α 2,3, α 2,6, and α 2,8 linked sialic acids. Peptide:N-glycosidase F (Endoglycosidase F) treatment was used (37°C for 2 h) to digest N-linked oligosaccharides following the manufacturer's instructions.

Electrophoresis and Immunoblot Analysis. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on 5 µg of membrane proteins or 20 µl of concentrated medium following Laemmli (19), in reducing conditions when specified. Proteins were transferred to Immobilon in buffer consisting of 20% methanol, 200 mM glycine and 25mM Tris, pH 8.3. After transfer, the membranes were blocked with 10% non-fat milk, in phosphate-buffered saline for 1 h at 37 ºC, and then incubated with antibodies raised against SSAO, GLUT-4 or caveolin-1. Transfer was confirmed by Coomassie Blue staining of the gel after electroblot. The immune complex was detected using the ECL *Western blot* detection system. Immunoblots were performed in conditions in which autoradiographic detection was in the linear response range.

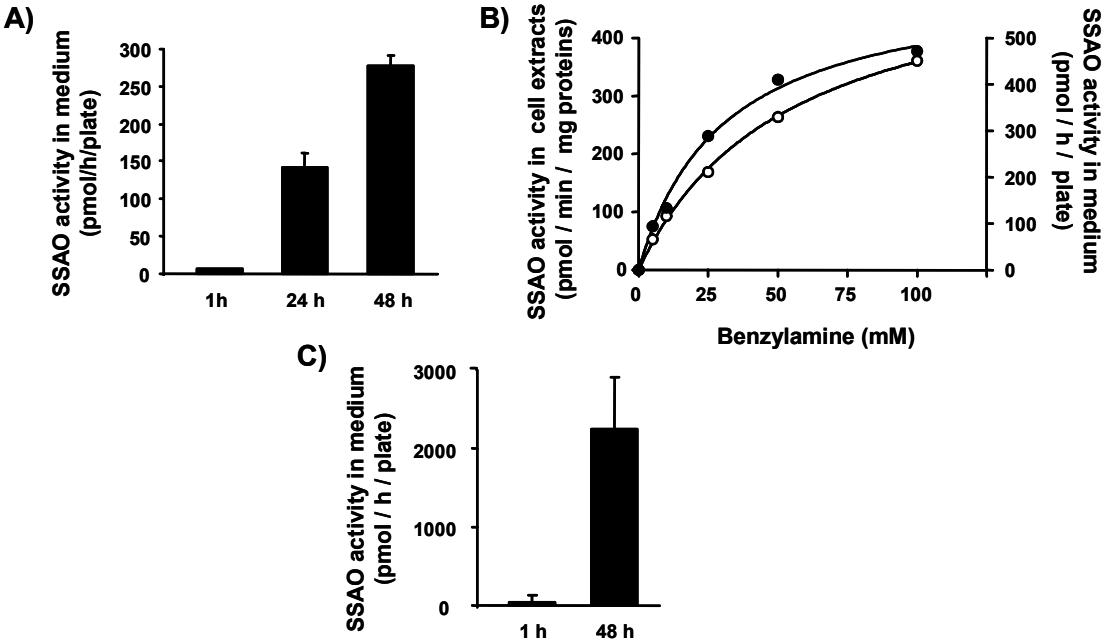


Figure 1. 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue release SSAO activity to the culture medium.
A) 3T3-L1 adipocytes were incubated in bovine serum-free medium for 1h, 24h or 48h and the medium was then concentrated. The SSAO activity was determined by incubating 20 µl of medium with 25 µM of radiolabelled benzylamine for 1 h at 37ºC, followed by extraction of the reaction products and counting. Values are means ± SEM of 3 independent observations per group, each determination being processed in duplicate.
B) Kinetic of SSAO activity released in the 3T3-L1 medium compared with the cell extract activity. The Michaelis-Menten constant Km of 3T3-L1 membrane and medium SSAO activity was determined by incubating 3T3-L1 extracts (5 µg of proteins) (closed circles and left Y-axis) or concentrated 3T3-L1 serum free medium (20 µl) (open circles and right Y-axis) with different concentrations of radiolabelled benzylamine from 5 to 100 µM. The Km values were determined (see text for mean ± SEM values). A representative graph from 3 three independent experiments is shown.
C) Human adipose tissue explants were cultured and incubated for1 h or 48 h in FCS-free medium. At the end of the incubation, the medium was collected. The SSAO activity was determined as described above. Values are means ± SEM of 3 independent observations, each determination being processed in duplicate.

Determination of Semicarbazide-sensitive Amine Oxidase Activity. Amine Oxidase activity was determined radiochemically following Fowler and Tipton (37). The reaction was performed in 200 µl of 0.2 M phosphate buffer at 37ºC in the presence of the indicated concentrations of benzylamine (0.4 µCi/ assay) at pH 7.4 for 60 min. Blank values were measured in assays pre-incubated for 15 minutes with 1 mM semicarbazide in order to totally inhibit SSAO activity. Reactions were stopped by the addition of 50 µl of 4N HCl, and the reaction products were extracted with toluene/ethyl acetate 1:1 (v/v) before liquid scintillation counting. The kinetic parameters were calculated using the non-linear regression analysis of Graph-Pad Prism (GraphPad Software Inc.). The SSAO activity present in the medium was expressed as pmol/h/plate, one plate representing 2.5 ± 0.3 mg of protein and around 3 x10^6 cells.

Statistics. Results are given as mean ± S.E.M. Statistical significance was assessed by one-tail unpaired Student's *t* test.

RESULTS

3T3-L1 adipocytes and human explants of adipose tissue released SSAO activity to the medium. To assess whether adipocytes secrete soluble SSAO protein, 3T3-L1 adipocytes were shifted in a defined medium without fetal bovine serum, to avoid contamination with the fetal bovine SSAO present in the serum. The serum-free medium was collected after 1, 24 or 48 h of incubation. The amount of SSAO protein in the medium was detected by *Western blot* and the SSAO activity was assayed as radiolabelled benzylamine oxidation. VAP-1/SSAO protein amount and activity were also assayed on cell extracts.

SSAO activity was detected in the medium, increasing in a time-dependent manner (figure 1A). After one hour in contact with differentiated adipocytes the medium did not present any siginificant SSAO activity. After 24 h, SSAO activity was detected (141 ± 19 nmol / h / plate), which doubled in 2 days (278 ± 13 nmol / h / plate). No changes were observed in the membrane semicarbazide-sensitive benzylamine oxidation at 24 h and 48 h (data not shown). The K_m values of the benzylamine oxidation catalyzed by the medium and the membrane preparations (43 ± 8 µM and 25 ± 5 µM respectively) (Figure 1B) indicate that both activities are closely related.

Human adipocytes show high SSAO activity (38). In keeping with the prior observations, human adipose tissue explants were prepared. Subcutaneous adipose tissue was dissected, placed in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and one day later, the medium was changed to FCS-free DMEM. After 48 h, the medium of the human explants also contained significant SSAO activity

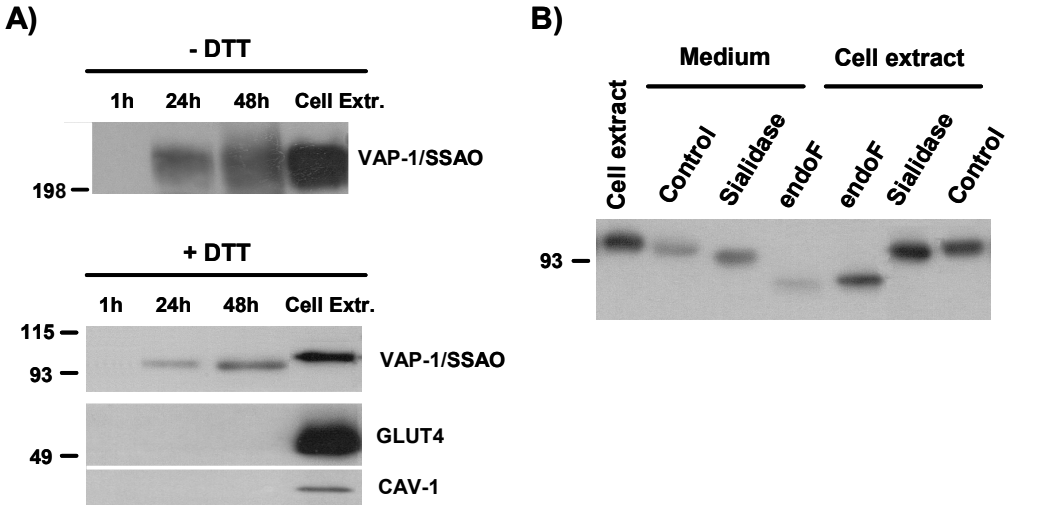


Figure 2. The soluble SSAO and the integral membrane proteins are a dimeric structure and present similar level of N-glycosylation and sialidation.
A) 3T3-L1 adipocytes were incubated in bovine serum-free medium for 1 h, 24 h or 48 h, and the corresponding medium and 3T3-L1 cells were processed as described in material and methods. VAP-1/SSAO abundance in the 3T3-L1 medium (20 µl) (1 h, 24 h, 48 h) and in the cell extract (5 µg of proteins) was assayed by Western blot in non-reducing (-DTT 2 mM) and reducing conditions (+ DTT 2 mM). GLUT4 and Caveolin-1 proteins were used to detect any contamination of the medium by cell ghosts. The positions of standard molecular weight are indicated. Autoradiogram representative of 3 independent experiments.
B) Medium and cell extracts after 48 h of culture were digested with sialidase or endoglycosidase F as described in materials and methods in order to eliminate the sialic acid residues and/or the N-glycosylation. For each treatment, the electrophoretic mobility of SSAO/VAP-1 protein was assayed by Western blot. Autoradiogram representative of 3 independent experiments.

(Figure 1C).

3T3-L1 adipocytes produce a soluble VAP-1/SSAO protein distinct from the integral membrane form. In parallel to the time-dependent enhancement of the soluble SSAO activity the amount of VAP-1/SSAO protein present in the medium also increased (Figure 2A). SSAO was hardly detected and after 48 h incubation the amount of protein increased by 220% (n = 4) versus 24 h. Like the membrane form, the soluble protein was dimeric in non-reducing conditions, but monomeric after dithiotreitol treatment (Figure 2A). Undifferentiated adipocytes, which do not express surface integral SSAO (34,39), did not release any detectable SSAO enzymatic activity or SSAO protein (data not shown).

A possible contamination of the collected and concentrated media by SSAO-containing adipocyte cell membranes were ruled out because i) neither GLUT4 nor caveolin-1 was detected in the medium, while both were detected in 3T3-L1 extracts (Figure 2A) ii) as observed in reducing conditions, the SSAO in the medium is approximately 2 kDa smaller than that in adipocytes (Figure 2A).

The soluble SSAO and the integral membrane protein present similar amounts of N-glycosylation and sialidation. SSAO is a type 2 membrane protein with a short cytoplasmic N-terminus, a single transmembrane domain and a large extracellular domain. It appears to be a mushroom-shaped dimer with each monomer containing putative attachment sites for 6 N-linked glycosylation sites (40,41).

SSAO secreted by 3T3-L1 adipocytes is also N-glycosilated and sialilated (Figure 2B). The treatments with endoglycosidase F or with sialidase caused an identical change in mobility of both membrane and soluble SSAO protein (Figure 2B) (corresponding to changes of 3 and 15 kDa after endoglycosidase F and sialidase treatment, respectively). The difference in mobility between the soluble and the membrane protein after digestion by sialidase or endoglycosidase F is not due to differences in O-glycosylation levels: it was shown that O-linked sugar motifs were minor if not absent from the mouse VAP-1/SSAO protein (33). The electrophoretic differences observed between the membrane and the soluble

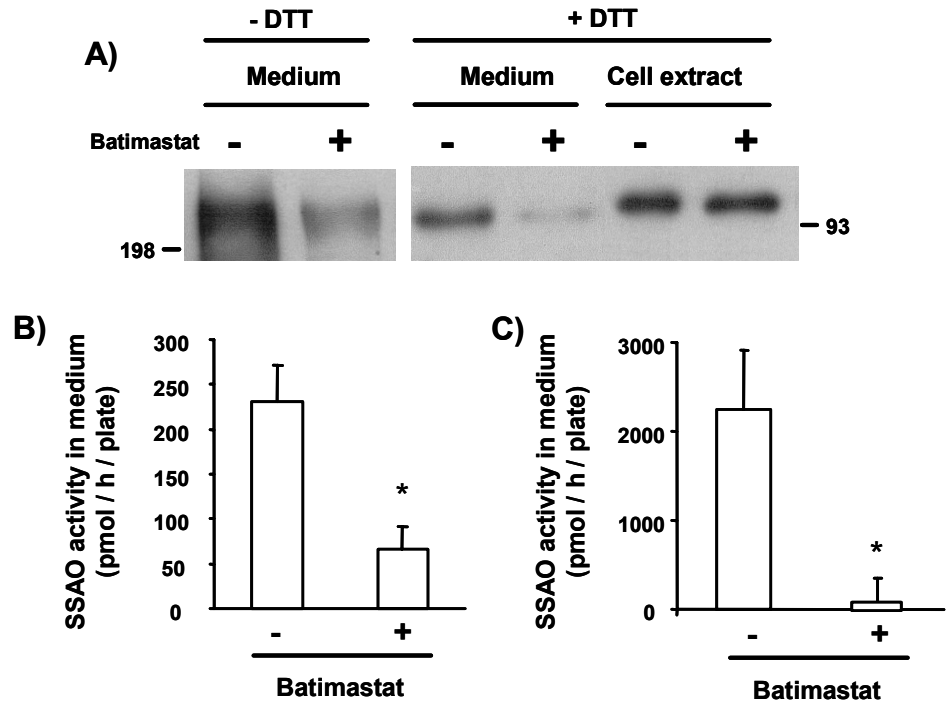


Figure 3. The release of SSAO by adipocytes is a metalloprotease-dependent process.
A) 3T3-L1 adipocytes were incubated in 48 h with or without 5 µM batimastat and the medium and the 3T3-L1 cells were processed (see described in material and methods). VAP-1/SSAO abundance in the 3T3-L1 medium (20 µl) and in the cell extract preparation (5 µg of proteins) was assayed by Western blot in non-reducing and reducing conditions. Autoradiogram representative of 3 independent experiments.
B and C) SSAO activity determined in the control and batimastat-treated media from 3T3-L1 (B) and human adipose tissue explants (C). Values are mean ± SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. *, $P < 0.05$.

form is thus probably due to a partial proteolysis.

The release of SSAO by adipocytes is dependent on metalloprotease activity. Next, we examined whether the release of SSAO by adipocytes was consequence of a proteolytic process. The putative cleavage site was located at the limit between the transmembrane domain and the extracellular domain (24). The differences in apparent molecular weights (Figure 2) between the soluble and the membrane form are consistent with such a cleavage site. Because of the growing importance of matrix metalloproteases in the adipocyte physiology (42-44) we studied the effect of a matrix metalloprotease inhibitor on secreted SSAO levels. 3T3-L1 adipocytes were incubated in the presence or absence of the hydroxamic acid-base inhibitor batimastat (BB94) and then SSAO amount and activity in the medium were assayed.

While adipocyte membrane SSAO level was unaffected by the treatment, the presence of batimastat decreased the release of SSAO protein to 20 ± 1% of control (Figure 3A), and the activity in the medium was also reduced to 20% of control (Figure 3B). Release of SSAO activity by human adipose explants was completely inhibited by batimastat (Figure 3C).

Hence, the release of SSAO by adipose cells seems to be a proteolytic process which implicates metalloproteases.

The release of SSAO by adipocytes is a hormone-regulated process. To further study the possible regulation of soluble SSAO release by factors implicated in adipose tissue physiopathology and diabetes, 3T3-L1 adipocytes were incubated in the presence or absence of different hormones or metabolites for 48 h.

3T3-L1 adipocytes are usually cultured in a glucose-rich medium (25 mM glucose). For our purpose, 3T3-L1 adipocytes were incubated for four days in a medium containing only 5 mM glucose. The release of SSAO was not affected (data not shown).

cAMP and the cytokine TNFα have a key role in the control of adipose tissue metabolism and both have been implicated as triggers of insulin resistance

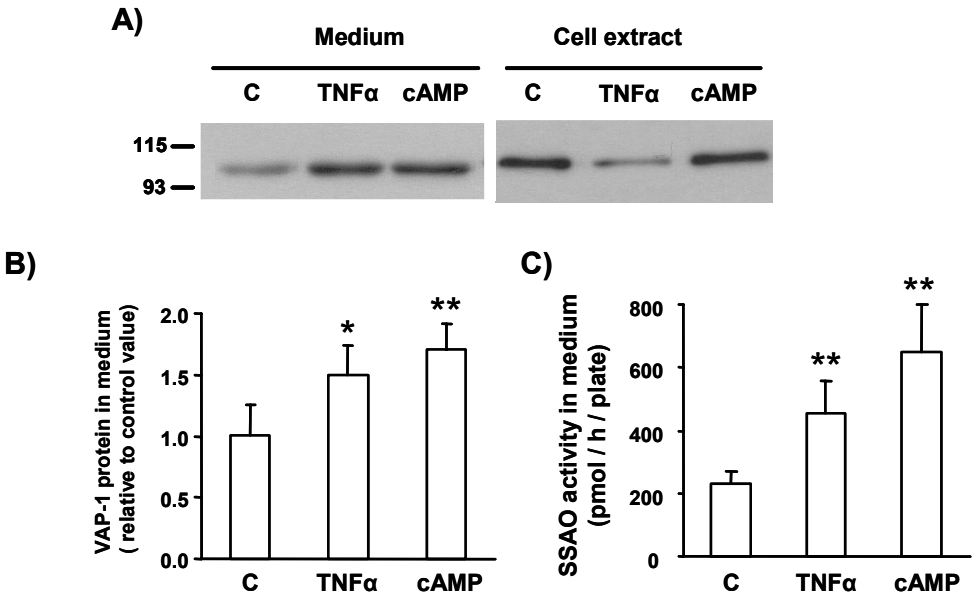


Figure 4. TNFα and dibutyryl-cAMP enhanced the release of VAP-1/SSAO by 3T3-L1 adipocytes.
A) 3T3-L1 adipocytes were incubated in bovine serum-free medium for 48 h with or without 5 nM TNFα or 100 µM dibutyryl-cAMP and the medium and the 3T3-L1 cells were processed at the end of the treatment (see material and methods). A) VAP-1/SSAO abundance in the 3T3-L1 medium (20 µl) (left panel) and in the cell extract preparation (5 µg of proteins) (right panel) was assayed by immunoblot under reducing conditions. Autoradiograms representative of 4-6 independent experiments.
B) VAP-1/SSAO protein levels in medium were quantified by densitometry of the autoradiograms (histogram). Values, relative to control are means ± SEM of 4-6 independent experiments: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.02$.
C) The SSAO activity was determined in the control and the treated media as described in the legend of figure 1. Values, expressed as pmol of oxidized benzylamine per h per plate, are mean ± SEM of 4-6 independent experiments performed in duplicate. **, $P < 0.02$.

(45,46). It was thus relevant to study the effects of both factors on SSAO release by adipocytes. As previously described in 3T3 L1 cells (34), TNFα decreased the SSAO content in the adipocyte extracts. There was no change in cell extract VAP-1/SSAO expression after the treatment with dibutyryl-cAMP (Figure 4A). However, both effectors, db-cAMP and TNFα, increased protein amount and enzymatic activity in the incubation medium (figure 4B and 4C). We obtained similar results with 10 µM isoproterenol, a β-adrenergic compound which rises levels of cAMP (180 ± 34% relative to the released SSAO activity in control conditions, $p < 0,05$).

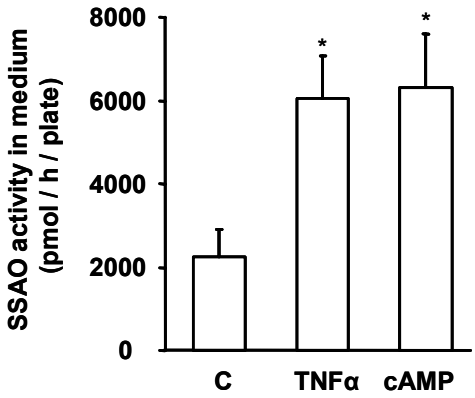


Figure 5. Explants of human adipose tissue release VAP-1/SSAO activity in a regulated manner.
The human subcutaneous adipose tissue cut into small pieces were placed in DMEM supplemented with 5% fetal calf serum and maintained at 37°C in a 7% CO_2 chamber. One day later, the medium was changed to FCS-free DMEM and explants were treated or not with 5 nM human TNFα or 100 µM dibutyryl-cAMP. At the end of the treatments, the SSAO activity of the concentrated media was determined as described in the legend of figure 1. Values are means ± SEM of 3 separate experiments performed in duplicate *, $P < 0.05$.

Because plasma SSAO levels are also high in human in type 1 and type 2 diabetes (27,29,30), we examined whether this release could be regulated by TNFα and cAMP. As for 3T3-L1 cells, both agents caused a 3 fold stimulation in the release of SSAO by human explants (Figure 5).

The release of SSAO by adipocytes is regulated by semicarbazide, an inhibitor of SSAO activity. To assess the influence of the enzyme activity on SSAO shedding, 3T3-L1 cells were treated with the inhibitor semicarbazide.

After 48 h of treatment, semicarbazide completely inhibited the amine oxidase activity in the medium and in the corresponding cell extract (data not shown). The protein amount was unchanged in the cell extracts (data not shown) but increased in the medium (Figure 6A).

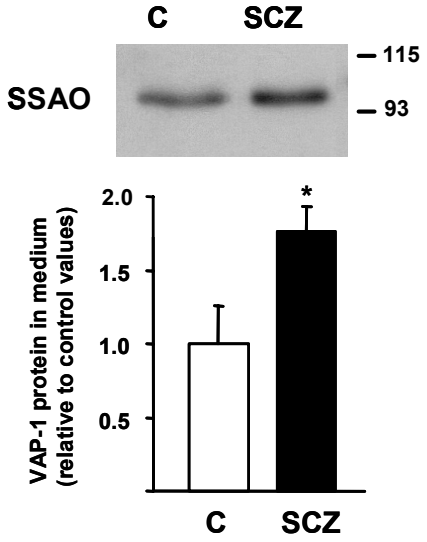


Figure 6. Regulation of SSAO release by 3T3-L1 adipocytes in the presence of semicarbazide.
3T3-L1 adipocytes were incubated in bovine serum-free medium for 48 h with or without semicarbazide (SCZ). The medium VAP-1/SSAO was assayed by Western blot in reducing conditions (autoradiogram) and quantified by densitometry. Autoradiograms are representative of 3-9 separate experiments. * significant at $P < 0.05$.

Diabetes and partial ablation of rat internal adipose tissue reduce the amount of plasma SSAO activity. Based on the fact that the release of VAP-1/SSAO by 3T3-L1 adipocytes and human explants was regulated by factors implicated in insulin resistance of adipose tissue such as TNFα cAMP, we thought relevant to determine the plasma SSAO activity in animals presenting modified adipose tissue metabolism or fat mass such as diabetes or adipose tissue ablation.

As previously described (28), we observed that streptozotocin-induced diabetic rats, a model of type 1 diabetes, showed increased SSAO activity in the serum. In parallel, we also found an elevated SSAO activity in the plasma of Goto-Kakizaki rats, a model of type 2 diabetes (Figure 7A).

To assess the impact of adipose tissue *in vivo* we also tested the consequence of adipose tissue removal on plasma SSAO activity. Both epididymal and perirenal adipose tissue of *Wistar* rats weighing 175-200 g were removed (3 ± 0.5 g). Soluble SSAO activity was measured before and after the adipose

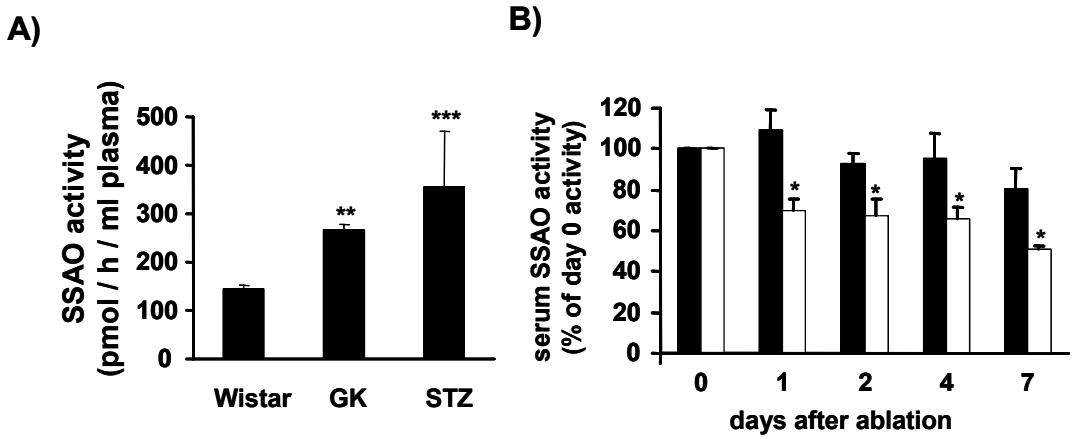


Figure 7. Serum SSAO activity is regulated by modifications of the adipose tissue metabolism .
A) Serum SSAO activity is enhanced in type 1 and type 2 diabetic rats.
Serum SSAO activity in control, Goto-Kakizaki diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats (3-5 animals per group) was determined as described in materials and methods by incubating 40 µl of plasma with 25 µM of radiolabelled benzylamine for 1 h at 37ºC followed by extraction of the benzaldehyde and counting. Values are means ± SEM of 3-5 independent observations per group.(** and ** indicate significant differences compared to the control group at $P < 0.02$ and $P < 0.01$ respectively).
B) Partial ablation of internal white adipose tissue reduces plasma SSAO activity**.**
Wistar rats epididymal and perirenal white adipose tissue were surgically removed (open bars) or not (sham operated animals, black bars) as described in materials and methods. Blood extraction and plasma preparations were processed before surgery and at days 1, 2, 3 and 7 after surgery. The SSAO activity was determined as described in the legend of figure 1. Values are expressed as percentage of the activities determined before ablation (100 %). *, $P < 0.05$.

tissue ablation. In the ablated group SSAO activity decreased to 70%, while in the sham-operated group the values remained unchanged. SSAO activity levels remained low for 7 days (Figure 7B).

DISCUSSION

The present study shows the release of VAP-1/SSAO by 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue explants by a matrix metalloprotease process. We also describe the stimulation of this release by TNFα, cAMP and semicarbazide and finally the *in vivo* regulation of VAP-1/SSAO levels in parallel with modifications of adipose tissue metabolism or mass.

Depending on the adhesion protein, the corresponding soluble form can be released into the circulation *via* different mechanisms: shedding from the membrane-bound form or alternative splicing of the gene encoding the integral protein. The present data suggest that this release is by shedding: i) the differences of electrophorotic mobility between the soluble form and the membrane form of 3T3-L1 VAP-1/SSAO corresponds to approximately 2 kDa (Figure 2) which is consistent with the loss of the transmembrane domain (24), ii) Both the soluble and membrane-bound proteins show similar levels of glycosylation and sialidation (Figure 2B) and iii) the metalloprotease inhibitor batimastat almost abolished the release of SSAO by 3T3-L1 and by human adipose tissue. Matrix metalloproteases (MMP) represent a family of 24 neutral endopeptidases that cleave all the extracellular matrix components as well as other proteins, such as adhesion molecules. Interest in the role of MMP in adipose tissue physiology. The expression of several isoforms is enhanced during the conversion of preadipocytes into adipocytes and inhibitors of the MMP block this differentiation process (42-44).

Circulating levels of VAP-1 SSAO are increased in type I diabetes (27,28) and type II diabetes (27,29,30). In this regard, TNFα or cAMP induced the release of VAP-1/SSAO by adipocytes. TNFα prevents obesity through inhibition of lipogenesis, increased lipolysis and facilitation of adipocyte death via apoptosis (47). cAMP can inhibit glucose transport in adipocytes (46) and the expression of GLUT4 (48-50). Finally, mices that are knock-out for the Gs protein (51) or TNFα (52) have enhanced insulin sensitivity. Interestingly, the present study shows that both factors, which are potential mediators of insulin resistance, clearly enhance the release of VAP-1/SSAO by 3T3-L1 adipocytes (Figure 4) and human adipose tissue (Figure 5). Our observations also indicate that under situations of insulin resistance, the release of SSAO by adipocytes is

enhanced.

In keeping with these *in vitro* observations, we found that plasmatic VAP-1/SSAO activity increased in two animal models of insulin resistance (Figure 6A). This is the first description of a rise in SSAO activity in a rat model of type 2 diabetes. The Goto-Kakizaki rat could be an interesting model for the study of circulating VAP-1/SSAO in diabetic physiopathology.

Internal adipose tissue was partially ablated to assess the capacity of adipocytes to release VAP-1/SSAO *in vivo*: a significant decrease in the amount of serum SSAO was observed (Figure 6B). Recently it has been shown that weight loss results in a significant reduction of soluble adhesion molecules in obese subjects (53). It may be of interest to assess whether adipose tissue is a source of adhesion molecules other than VAP-1/SSAO. Besides its well known energetic functions, several major discoveries have implicated the adipose tissue in regulatory functions through the secretion of endocrine or paracrine factors (32). As a source of soluble adhesion molecules enhanced in diabetes the adipose tissue may contribute to the cardiovascular complications associated with diabetes. We demonstrated that adipocytes release a soluble form of VAP-1/SSAO protein by shedding the membrane form under the control of metalloprotease activity and that this process is stimulated by factors implicated in insulin resistance *in vitro* or *in vivo*. Through its capacity to enhance circulating lymphocyte binding to endothelial cells (4) this increased circulating SSAO observed could participate in the development of cardiovascular complications such as angiopathy or retinopathy commonly observed in diabetes. The present study provides a new link between adipose tissue, inflammation and diabetes cardiovascular complications.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Josep Chillarón and Marta Camps for helpful discussions, the personnel from the animal facility of the Barcelona Science Park and Robin Rycroft for his editorial support. This study was supported by research grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PM98/0197), from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2002-02125), grant 1999SGR 00039 from Generalitat de Catalunya, Fondo de Investigaciones Sanitarias (00/0125), European Commission (Quality of Life, QLG-CT-1999-00295), COST B17 Action and Fundació Marató de TV3 (300720). A.A. is a recipient of a predoctoral fellowship from the Universitat de Barcelona.

REFERENCES

1. Butcher,EC, Picker,LJ: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60-66, 1996
2. Springer,TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314, 1994
3. Gearing,AJ, Newman,W: Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol.Today* 14:506-512, 1993
4. Kurkijarvi,R, Adams,DH, Leino,R, Mottonen,T, Jalkanen,S, Salmi,M: Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): increased serum levels in inflammatory liver diseases. *J Immunol.* 161:1549-1557, 1998
5. Rothlein,R, Mainolfi,EA, Czajkowski,M, Marlin,SD: A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol.* 147:3788-3793, 1991
6. Blann,AD, Tse,W, Maxwell,SJ, Waite,MA: Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in essential hypertension. *J Hypertens.* 12:925-928, 1994
7. Gearing,AJ, Hemingway,I, Pigott,R, Hughes,J, Rees,AJ, Cashman,SJ: Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 667:324-331, 1992
8. Lampeter,ER, Kishimoto,TK, Rothlein,R, Mainolfi,EA, Bertrams,J, Kolb,H, Martin,S: Elevated levels of circulating adhesion molecules in IDDM patients and in subjects at risk for IDDM. *Diabetes* 41:1668-1671, 1992
9. Olson,JA, Whitelaw,CM, McHardy,KC, Pearson,DW, Forrester,JV: Soluble leucocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy stimulate retinal capillary endothelial cell migration. *Diabetologia* 40:1166-1171, 1997
10. Roep,BO, Heidenthal,E, de Vries,RR, Kolb,H, Martin,S: Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 in insulin-dependent diabetes *mellitus*. *Lancet* 343:1590-1593, 1994
11. Bluher,M, Unger,R, Rassoul,F, Richter,V, Paschke,R: Relation between glycaemic control, hyperinsulinaemia and plasma concentrations of soluble adhesion molecules in patients with impaired glucose tolerance or Type II diabetes. *Diabetologia* 45:210-216, 2002
12. Leinonen,E, Hurt-Camejo,E, Wiklund,O, Hulten,LM, Hiukka,A, Taskinen,MR: Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 166:387-394, 2003
13. Marfella,R, Esposito,K, Giunta,R, Coppola,G, De Angelis,L, Farzati,B, Paolisso,G, Giugliano,D: Circulating adhesion molecules in humans: role of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Circulation* 101:2247-2251, 2000
14. Hackman,A, Abe,Y, Insull,W, Jr., Pownall,H, Smith,L, Dunn,K, Gotto,AM, Jr., Ballantyne,CM: Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 93:1334-1338, 1996
15. Blann,AD, Lip,GY: Cell adhesion molecules in cardiovascular disease and its risk factors--

what can soluble levels tell us? *J Clin.Endocrinol.Metab* 85:1745-1747, 2000
16. Ridker,PM, Hennekens,CH, Roitman-Johnson,B, Stampfer,MJ, Allen,J: Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 351:88-92, 1998
17. Koch,AE, Halloran,MM, Haskell,CJ, Shah,MR, Polverini,PJ: Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 376:517-519, 1995
18. Andres,N, Lizcano,JM, Rodriguez,MJ, Romera,M, Unzeta,M, Mahy,N: Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Histochem.Cytochem.* 49:209-217, 2001
19. Hwang,ST: Mechanisms of T-cell homing to skin. *Adv.Dermatol.* 17:211-241, 2001
20. Atkinson,MA, Eisenbarth,GS: Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358:221-229, 2001
21. Glass,CK, Witztum,JL: Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503-516, 2001
22. Salmi,M, Jalkanen,S: A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. *Science* 257:1407-1409, 1992
23. Bono,P, Salmi,M, Smith,DJ, Jalkanen,S: Cloning and characterization of mouse vascular adhesion protein-1 reveals a novel molecule with enzymatic activity. *J Immunol.* 160:5563-5571, 1998
24. Smith,DJ, Salmi,M, Bono,P, Hellman,J, Leu,T, Jalkanen,S: Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. *J Exp.Med.* 188:17-27, 1998
25. Boomsma,F, van Veldhuisen,DJ, de Kam,PJ, Man,i, V, Mosterd,A, Lie,KI, Schalekamp,MA: Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc.Res.* 33:387-391, 1997
26. Kurkijarvi,R, Jalkanen,S, Isoniemi,H, Salmi,M: Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) mediates lymphocyte-endothelial interactions in chronic kidney rejection. *Eur.J Immunol.* 31:2876-2884, 2001
27. Boomsma,F, van den Meiracker,AH, Winkel,S, Aanstoot,HJ, Batstra,MR, Man in 't Veld AJ, Bruining,GJ: Circulating semicarbazide-sensitive amine oxidase is raised both in type I (insulin-dependent), in type II (non-insulin-dependent) diabetes *mellitus* and even in childhood type I diabetes at first clinical diagnosis. *Diabetologia* 42:233-237, 1999
28. Hayes,BE, Clarke,DE: Semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in streptozotocin diabetic rats. *Res.Commun.Chem.Pathol Pharmacol.* 69:71-83, 1990
29. Garpenstrand,H, Ekblom,J, Backlund,LB, Oreland,L, Rosenqvist,U: Elevated plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in Type 2 diabetes *mellitus* complicated by retinopathy. *Diabet.Med.* 16:514-521, 1999
30. Salmi,M, Stolen,C, Jousilahti,P, Yegutkin,GG, Tapanainen,P, Janatuinen,T, Knip,M, Jalkanen,S, Salomaa,V: Insulin-regulated increase of soluble vascular adhesion protein-1 in diabetes. *Am J Pathol* 161:2255-2262, 2002
31. Kurkijarvi,R, Yegutkin,GG, Gunson,BK, Jalkanen,S, Salmi,M, Adams,DH: Circulating soluble vascular adhesion protein 1 accounts for the increased serum monoamine oxidase activity in chronic liver disease. *Gastroenterology* 119:1096-1103, 2000
32. Ahima,RS, Flier,JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol.Metab* 11:327-332, 2000
33. Bono,P, Jalkanen,S, Salmi,M: Mouse vascular adhesion protein 1 is a sialoglycoprotein with enzymatic activity and is induced in diabetic insulitis. *Am J Pathol* 155:1613-1624, 1999
34. Moldes,M, Feve,B, Pairault,J: Molecular cloning of a major mRNA species in murine 3T3 adipocyte lineage. differentiation-dependent expression, regulation, and identification as semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Biol.Chem.* 274:9515-9523, 1999
35. Morin,N, Visentin,V, Calise,D, Marti,L, Zorzano,A, Testar,X, Valet,P, Fischer,Y, Carpene,C: Tyramine stimulates glucose uptake in insulin-sensitive tissues *in vitro* and *in vivo* via its oxidation by amine oxidases. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 303:1238-1247, 2002
36. Gumà,A, Mora,C, Santalucia,T, Vinals,F, Testar,X, Palacin,M, Zorzano,A: System A transport activity is stimulated in skeletal muscle in response to diabetes. *FEBS Lett.* 310:51-54, 1992
37. Fowler,CJ, Tipton,KF: Concentration dependence of the oxidation of tyramine by the two forms of rat liver mitochondrial monoamine oxidase. *Biochem.Pharmacol.* 30:3329-3332, 1981
38. Morin,N, Lizcano,JM, Fontana,E, Marti,L, Smih,F, Rouet,P, Prevot,D, Zorzano,A, Unzeta,M, Carpene,C: Semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates stimulate glucose transport and inhibit lipolysis in human adipocytes. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 297:563-572, 2001
39. Fontana,E, Boucher,J, Marti,L, Lizcano,JM, Testar,X, Zorzano,A, Carpene,C: Amine oxidase substrates mimic several of the insulin effects on adipocyte differentiation in 3T3-F442A cells. *Biochem.J* 356:769-777, 2001
40. Salmi,M, Jalkanen,S: VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends Immunol.* 22:211-216, 2001
41. Salminen,TA, Smith,DJ, Jalkanen,S, Johnson,MS: Structural model of the catalytic domain of an enzyme with cell adhesion activity: human vascular adhesion protein-1 (HVAP-1) D4 domain is an amine oxidase. *Protein Eng* 11:1195-1204, 1998
42. Alexander,CM, Selvarajan,S, Mudgett,J, Werb,Z: Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J Cell Biol.* 152:693-703, 2001
43. Bouloumie,A, Sengenes,C, Portolan,G, Galitzky,J, Lafontan,M: Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 50:2080-2086, 2001
44. Croissandeau,G, Chretien,M, Mbikay,M: Involvement of matrix metalloproteinases in the adipose conversion of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem.J* 364:739-746, 2002
45. Hotamisligil,GS, Shargill,NS, Spiegelman,BM: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993
46. Piper,RC, James,DE, Slot,JW, Puri,C, Lawrence,JC, Jr.: GLUT4 phosphorylation and inhibition of glucose transport by dibutyryl cAMP. *J Biol.Chem.* 268:16557-16563, 1993

47. Sethi,JK, Hotamisligil,GS: The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin.Cell Dev.Biol.* 10:19-29, 1999
48. Cooke,DW, Lane,MD: Transcription factor NF1 mediates repression of the GLUT4 promoter by cyclic-AMP. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 260:600-604, 1999
49. Vinals,F, Ferre,J, Fandos,C, Santalucia,T, Testar,X, Palacin,M, Zorzano,A: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulates GLUT4 and GLUT1 glucose transporter expression and stimulates transcriptional activity of the GLUT1 promoter in muscle cells. *Endocrinology* 138:2521-2529, 1997
50. Yu,ZW, Buren,J, Enerback,S, Nilsson,E, Samuelsson,L, Eriksson,JW: Insulin can enhance GLUT4 gene expression in 3T3-F442A cells and this effect is mimicked by vanadate but counteracted by cAMP and high glucose--potential implications for insulin resistance. *Biochim.Biophys.Acta* 1535:174-185, 2001
51. Yu,S, Castle,A, Chen,M, Lee,R, Takeda,K, Weinstein,LS: Increased insulin sensitivity in Gsalpha knockout mice. *J Biol.Chem.* 276:19994-19998, 2001
52. Uysal,KT, Wiesbrock,SM, Marino,MW, Hotamisligil,GS: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389:610-614, 1997
53. Ferri,C, Desideri,G, Valenti,M, Bellini,C, Pasin,M, Santucci,A, De Mattia,G: Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertension* 34:568-573, 1999

El teixit adipós és un dels teixits de l'organisme, juntament amb les cèl·lules endolelials (Salmi and Jalkanen, 1992) i la musculatura llisa (Jaakkola *et al.*, 1999), que més expressa SSAO. La detecció quantitativa de l'SSAO en membrana plasmàtica d'adipòcits aïllats de rata indica que conté 14 x 10^6 còpies per cèl·lula (Morris *et al.*, 1997). Existeix també una forma soluble d'SSAO present a la circulació. Al sèrum d'individus sans aquesta forma es troba a una concentració de 50-140 ng/ml (Kurkijarvi *et al.*, 1998), els seus nivells es correlacionen amb el BMI (Meszaros *et al.*, 1999) i estan incrementats en algunes malalties hepàtiques (Kurkijarvi *et al.*, 1998) i renals (Kurkijarvi *et al.*, 2001) i en la diabetis de tipus 1 (Boomsma *et al.*, 1995b) i tipus 2 (Garpenstrand *et al.*, 1999).

Així doncs, a causa del paper central del teixit adipós en la diabetis (Ahima and Flier, 2000) i en l'elevada expressió d'SSAO que presenta, vam voler estudiar si la forma soluble de VAP-1/SSAO que es troba a la circulació l'alliberen pels adipòcits i quins són els processos que regulen l'alliberament. A fi de comprovar aquesta hipòtesi es van utilitzar adipòcits 3T3-L1, una línia cel·lular de ratolí, i explants de teixit adipós humà. Actualment es desconeix la procedència de l'SSAO circulant, ara bé, alguns autors han implicat de forma indirecta les cèl·lules endotelials hepàtiques en el seu alliberament: *a*) el clonatge de la forma soluble bovina es va fer a partir d'una llibreria de cDNA de fetge, basant-se en el fetque aquest teixit és una font de proteïnes plasmàtiques (Mu *et al.*, 1994); *b*) s'observa un augment de la forma soluble en malalties hepàtiques (Kurkijarvi *et al.*, 2000).

4.1. LES CÈL·LULES ADIPOSES ALLIBEREN LA FORMA SOLUBLE D'SSAO/VAP-1 PER UN MECANISME DE *SHEDDING*

Diverses evidències ens mostren que els adipòcits alliberen una forma activa de la proteïna SSAO:

1. En preparar i concentrar medi de cultiu que ha estat en contacte durant 1, 24 o 48 hores amb adipòcits 3T3-L1 i assajar l'activitat i la quantitat de proteïna presents en el medi, s'observà que els adipòcits alliberaven SSAO d'una forma constant (Figures 1 A i 2, article 4). La proteïna alliberada al medi de cultiu, després de dos dies d'incubació, correspon al 0,63% de la proteïna present a la membrana plasmàtica de la cèl·lula tenint en compte l'activitat en el medi, 278 ± 13 pmol/h/placa, i la present als homogenats dels adipòcits, 290 ± 40 pmol/min/mg de proteïna, i sabent que cada placa conté 2,5 ± 0,2 mg de proteïna.
2. L'anàlisi del medi de cultiu d'explants de teixit adipós humà ens va mostrar que els adipòcits humans també alliberaven la proteïna SSAO funcionalment activa (figura 1 C, article 4 i figura 33).

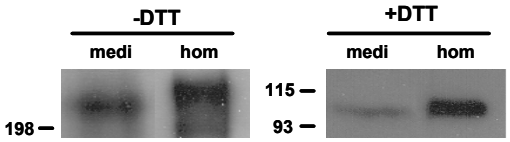


Figura 33. Presència de la proteïna SSAO al medi d'incubació d'explants de teixit adipós humà. Es van incubar explants humans de teixit adipós durant 48 hores amb medi de cultiu deplecionat en sèrum. S'analitzà per transferència *Western blot* l'abundància de SSAO al medi de cultiu i a homogenats del teixit adipós en absència (-DTT) i presència de 2 mM DTT. L'anticòs antiSSAO usat va ser el TK 10-79. Es mostra un revelat representatiu.

3. L'ablació del teixit adipós epididimal i perirenal de rates *Wistar* provocà una disminució del 30% dels nivells circulants d'SSAO (figura 7, article 4).

S'ha descartat que la proteïna present als medis de cultiu vingui d'una contaminació per la forma de membrana o bé que sigui la forma soluble present al medi de cultiu no deplecionat ja que:

1. Proteïnes de la membrana plasmàtica o de membrana intracel·lular com ara GLUT4 o caveolina 1 no es van detectar als medis preparats però sí als extractes cel·lulars (figura 2 A, article 4).
2. La proteïna secretada presentà una mobilitat electroforètica lleugerament superior a la de membrana. Una estimació del pes molecular indicà que era aproximadament 2 kDa més petita que la forma de membrana (figura 2 A, article 4).
3. Els adipòcits 3T3-L1 es cultiven en un medi que conté un 10% de sèrum fetal boví (FBS). Aquest FBS és ric en la forma soluble de la proteïna bovina i podria interferir amb els nostres estudis. Per aquest motiu, es va treballar amb un medi deplecionat que no contenia FBS. Malgrat això es va voler descartar que restes d'SSAO provinents del medi de cultiu en el qual les cèl·lules havien crescut i s'havien diferenciat poguessin contaminar els estudis. Per fer-ho, es va càrregar en paral·lel medi deplecionat que havia estat durant 48 hores en contacte amb les cèl·lules, homogenats totals de 3T3-L1 i medi de cultiu que conté un 10% d'FBS sense concentrar (figura 34). Tant en condicions reductores com no reductores s'observà que l'SSAO present en el medi de cultiu FBS té una mobilitat electroforètica inferior que l'alliberada per les cèl·lules i la de membrana. Així doncs, es va descartar que en els medis estudiats hi hagués contaminació per la forma bovina ja que en aquest cas s'obtindria un patró alterat de bandes en els assaigs de transferència *Western blot*.

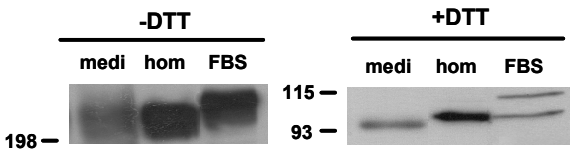


Figura 34. La proteïna SSAO present al sèrum FBS presenta una mobilitat electroforètica diferent. Anàlisi per transferència *Western blot* de l'SSAO present al medi que havia estat en contacte amb les cèl·lules (medi) durant 48 hores, a extractes totals de 3T3-L1 (hom) i a medi de cultiu FBS 10% (FBS) en condicions no reductores (-DTT) i en presència de 2 mM de DTT. Es van carregar 20 μl de medi deplecionat concentrat, 5 μg de proteïna i 20 μl de medi de cultiu FBS no concentrat respectivament. L'anticòs antiSSAO usat va ser el TK 10-79. Es mostra un revelat representatiu.

Les formes solubles de les proteïnes d'adhesió poden ser alliberades a la circulació gràcies a diferents mecanismes: a) sintetitzades a partir d'un gen diferent de la forma de membrana que inclou un pèptid senyal, b) a partir d'un *splicing* alternatiu del gen que codifica per la forma de membrana, c) per *shedding* o tall de la part extracel·lular de la forma de membrana.

Els resultats obtinguts en aquest treball ens indiquen que la forma soluble de l'SSAO es genera al teixit adipós per un procés de *shedding*:

1. La reducció del pes molecular de 2 kDa està d'acord amb la pèrdua del domini transmembrana i citoplasmàtic de la proteïna (Smith *et al.*, 1998).
2. Els valors de Km per a l'oxidació de benzilamina de l'activitat enzimàtica preparada de medi o membrana (43 ± 8 μM i 25 ± 5 μM, respectivament) són molt semblants (figura 1 B, article 4)
3. La proteïna soluble i la de membrana presenten la mateixa quantitat de glucosilacions i de residus d'àcid siàlic (figura 2 B, article 4).
4. L'inhibidor de metal·loproteases batimastat redueix entre un 80 i un 95% l'activitat SSAO al medi i la quantitat de proteïna alliberada pels adipòcits 3T3-L1 i pels adipòcits humans (figura 3, article 4).

El tall proteolític de l'SSAO de la membrana es va assajar també per inhibició de proteïnes cisteïna-proteasa. L'homologia entre la forma bovina clonada de la proteïna soluble (Mu *et al.*, 1994) i la proteïna de membrana humana (Smith *et al.*, 1998) i de ratolí (Bono *et al.*, 1998b) augmenta molt a partir d'una cisteïna (Cys41 de la forma de membrana i Cys40 de la forma soluble, vegeu la figura 13 de la introducció per l'alineament). Es van tractar les cèl·lules amb l'inhibidor de proteïnes cisteïna-proteasa E64 i l'inhibidor de proteïnes cisteïna- i serina-proteasa leupeptina i es va analitzar la quantitat de forma soluble al medi de cultiu. No es va observar cap canvi en la quantitat de proteïna ni en l'activitat SSAO present en el medi de

cultiu. Atesa la creixent importància de les metal·loproteases en la fisiologia del teixit adipós (Bouloumie *et al.*, 2001) i els estudis que impliquen les MMP en l'alliberament de la lisiloxidasa (Panchenko *et al.*, 1996) es va estudiar l'efecte de l'inhibidor genèric de MMP batimastat sobre la secreció d'SSAO. A fi d'establir quina de les MMP present als adipòcits és la responsable del *shedding* d'SSAO caldrà utilitzar, en un futur, inhibidors específics.

4.2. L'ALLIBERAMENT DE L'SSAO PELS ADIPÒCITS ÉS UN PROCÉS REGULAT PER DIFERENTS FACTORS

A causa de l'augment de la forma soluble de l'SSAO durant la diabetis i el paper del teixit adipós en el seu alliberament es va estudiar l'efecte de diversos factors implicats en la fisiologia del teixit adipós i en la fisiopatologia d'aquesta malaltia. S'ha observat un augment en l'activitat SSAO plasmàtica en dos models animals de diabetis, les rates diabètiques per estreptozotocina (Hayes and Clarke, 1990), un model de diabetis de tipus 1, i les rates Goto-Kakizaki, un model de diabetis de tipus 2 (figura 7 A, article 4 i figura 17 B).

Durant la diabetis *mellitus* els nivells de glucosa i d'insulina estan alterats i el teixit adipós presenta insulinoresistència. L'activitat SSAO en el medi d'adipòcits 3T3-L1 no es va veure modificada després de la incubació durant 48 hores amb 100 nM insulina o durant 4 dies amb un medi que només contenia 5 mM glucosa (els adipòcits 3T3-L1 es cultiven en un medi que conté altes concentracions de glucosa, 25 mM, Gibco núm.41966-029) (figura 35).

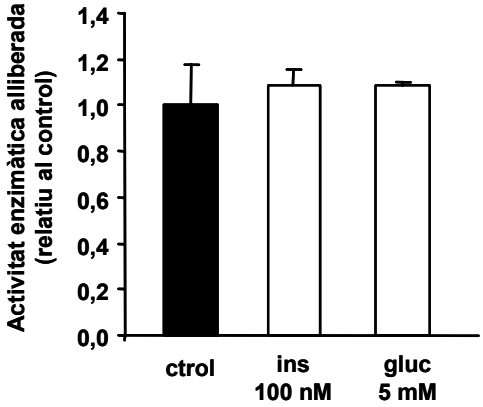


Figura 35. Activitat amino-oxidasa present al medi després de la incubació amb insulina o amb baixes concentracions de glucosa. Adipòcits 3T3-L1 es van incubar en medi deplecionat durant 48 hores en absència (ctrol) o presència de 100 nM insulina o durant 48 hores amb medi FBS amb només 5 mM glucosa seguides de 48 hores amb medi deplecionat amb 5 mM glucosa. Es va assajar l'activitat SSAO en 20 μl dels medis com a capacitat per oxidar la benzilamina. Les dades són la mitjana ± SE de 3-9 experiments.

Quan s'analitzà la quantitat de la proteïna present en el medi de cultiu per transferència *Western blot* (figura 36) s'observà una tendència a disminuir en presència d'insulina i un clar augment després de la reducció de la concentració de glucosa.

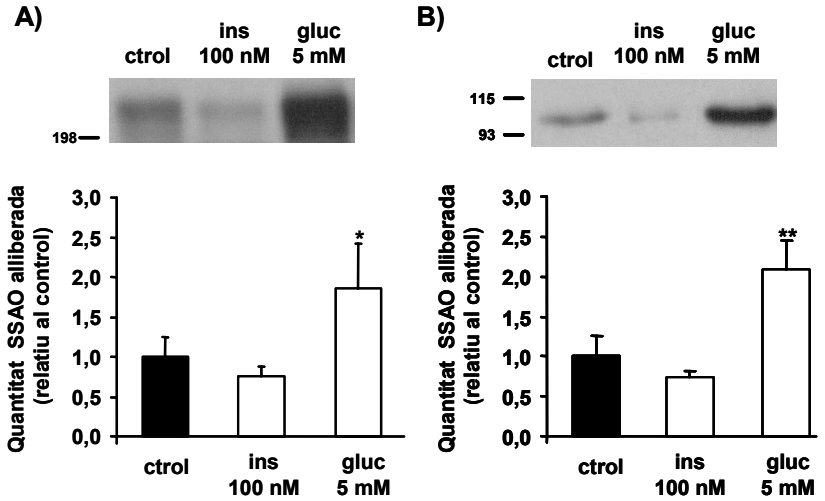


Figura 36. Regulació de l'alliberament d'SSAO per adipòcits 3T3-L1 en presència d'insulina o baixes concentracions de glucosa. Es va assajar la quantitat d'SSAO present en 20 μl de medi de les incubacions descrites a la figura 35 en condicions no reductores (**A**) i en presència de 2 mM DTT (**B**). Es mostra un revelat representatiu i la quantificació densitomètrica dels nivells de proteïna. Les dades són la mitjana ± SE de 3-9 experiments per grup. * $p < 0,01$ respecte del control.

Un estudi recent mostra que un *clamp* hiperinsulinèmic en humans diabètics de tipus 1, amb nivells d'insulina molt baixos, redueix els nivells plasmàtics d'SSAO (Salmi *et al.*, 2002). En el nostre cas, després de l'addició d'insulina durant 48 hores, no es van observar modificacions de l'activitat enzimàtica, i tot i que es va observar una tendència a la disminució de la quantitat d'SSAO, aquesta, però, no va ser significativa. Aquest resultat no està en contradicció amb les observacions *in vivo* ja que en el nostre model d'estudi es mesuren els nivells en el medi després de 48 hores no podent-se detectar efectes a curt termini de l'hormona per raó de les limitacions de detecció de l'SSAO en el medi de cultiu.

En el cas de la glucosa els resultats obtinguts són sorprenents; mentre que l'activitat no varia, la quantitat present al medi s'ha duplicat; sembla, doncs, que part de la proteïna alliberada no sigui activa. En aquest cas, però, no estem millorant l'estat diabètic en disminuir la concentració de glucosa de 25 a 5 mM ja que aquestes cèl·lules necessiten de les elevades concentracions de glucosa per al seu cultiu. No és, per tant, un bon model per estudiar els efectes de la glucosa sobre l'alliberament de l'SSAO; en aquest sentit, el fet que les cèl·lules 3T3-L1 es cultivin amb medis que contenen altes concentracions de glucosa i que la seva diferenciació depengui del tractament amb insulina ha fet que alguns autors les considerin un model *in vitro* de resistència a la insulina en termes de transport de glucosa (Nelson *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 1997). Aquest resultat ens suggereix que l'augment d'SSAO circulant en la diabetis no es pot explicar per un augment en la glucèmia i concorda amb els resultats *in vivo* que descarten el paper de la glucèmia en la regulació dels nivells plasmàtics d'SSAO (Salmi *et*

al., 2002).

El missatger secundari AMP cíclic (adenosina monofosfat, AMPc) i la citocina TNFα (factor de necrosis tumoral alfa) estan implicats en el metabolisme del teixit adipós i en processos de resistència a la insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993; Piper *et al.*, 1993). Per aquest motiu, es va estudiar el seu efecte sobre l'alliberament d'SSAO per adipòcits 3T3-L1 i adipòcits humans.

El TNFα està implicat en els processos de resistència a la insulina en múscul observats durant la diabetis de tipus 2 (vegeu el punt 1.2.2. de la introducció), actua al teixit adipós estimulant la lipòlisi (Sethi and Hotamisligil, 1999) de manera que augmenten els àcids grassos circulants implicats en la resistència al múscul. La incubació d'adipòcits 3T3-L1 amb TNFα provocà una disminució en el nivell d'SSAO a la membrana (Moldes *et al.*, 1999) (figura 4, article 4) i de la seva activitat (282 ± 29 i 172 ± 55 pmol/min/mg proteïna en situació control o en presència de TNFα, respectivament) (figura 37) i un augment en la proteïna i activitat en el medi (figura 4, article 4).

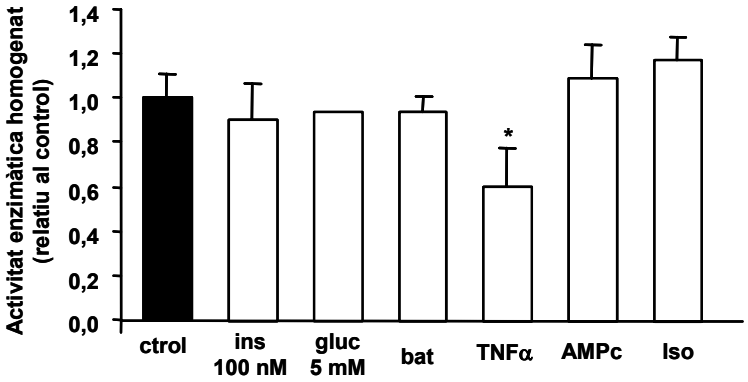


Figura 37. Activitat amino-oxidasa present a homogenats totals de cèl·lules 3T3-L1. Es va assajar l'activitat SSAO en 10 μg de proteïna provinents d'homogenats totals de cèl·lules que havien estat tractades durant 48 hores amb 100 nM insulina, 5 μM batimastat, 5 nM TNFα, 100 μM dibutiril-AMP-cíclic, 10 μM isoproterenol o que havien estat incubades durant 96 hores en un medi amb baixes concentracions de glucosa (5 mM). Durant les 48 hores de tractament el medi d'incubació estava deplecionat de sèrum. L'activitat es va mesurar com la capacitat d'oxidar benzilamina i s'expressa com a la mitjana ± SE de 3-8 experiments per grup. * $p < 0,05$.

L'AMPc inhibeix el transport de glucosa (Piper *et al.*, 1993) i l'expressió del transportador de glucosa GLUT4 en adipòcits (Cooke and Lane, 1999; Vinals *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001). La incubació d'adipòcits amb un anàleg de l'AMPc, el dibutiril-AMPc, tal com passava en el cas de TNFα, augmentà la quantitat i l'activitat SSAO en el medi de cultiu dels adipòcits 3T3-L1 (figura 4, article 4); en aquest cas no s'observen diferències en la proteïna de membrana (figura 37). Els mateixos resultats obtinguts amb l'anàleg de l'AMPc es van observar en l'incubar les cèl·lules amb isoproterenol un compost β-adrenèrgic que augmenta la síntesi d'AMPc al teixit adipós (figura 38).

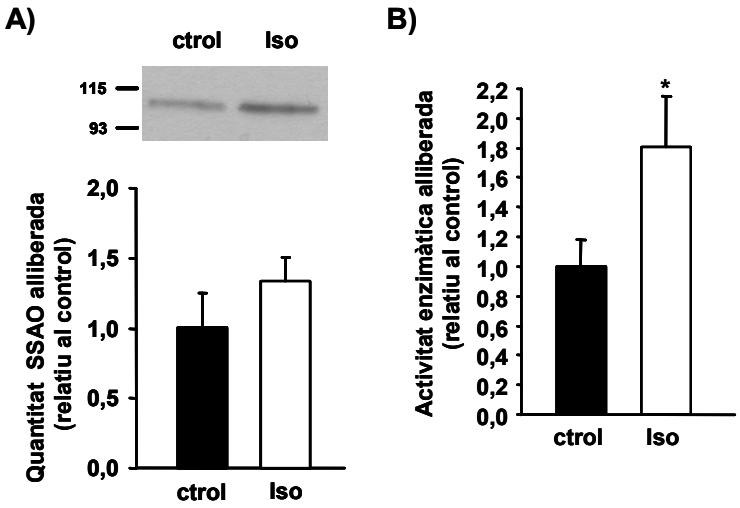


Figura 38. Regulació de l'alliberament d'SSAO per adipòcits 3T3-L1 amb isoproterenol. Adipòcits 3T3-L1 es van incubar en medi deplecionat durant 48 hores en absència (ctrol) o presència de 10 μM isoproterenol. Es van recollir i concentrar els medis de cultiu i s'assajà l'activitat (**A**) i l'abundància (**B**) d'SSAO present al medi. Es mostra un revelat representatiu. Els resultats són la mitjana ± SE de 3 observacions per grup. * $p < 0,05$.

L'augment de l'activitat i de la quantitat d'SSAO per la incubació amb TNFα i AMPc també es va observar en el cas dels explants de teixit adipós humà (figura 5, article 4).

Sembla, doncs, que els efectes sobre l'alliberament de l'SSAO de la cèl·lula adiposa durant l'estat diabètic no són causats directament per la glucosa o la insulina sinó per altres molècules implicades en la resistència a la insulina. En estats que simulen la manca d'insulina, i que, per tant, s'assimilen a l'estat diabètic (falta d'insulina en el cas de la diabetis tipus 1 o absència de resposta a aquesta en el cas de la diabetis de tipus 2), en els quals hi ha resistència a la insulina, absència de transport de glucosa i estimulació de la lipòlisi, mimetitzat *in vitro* per la presència de TNFα, dibutiril-AMPc o isoproterenol, l'adipòcit augmenta l'alliberament d'SSAO.

Cap de les molècules testades, excepte el TNFα com ja havia descrit Moldes i col·laboradors, van modificar l'activitat SSAO de la membrana plasmàtica (figura 37).

La incubació d'adipòcits 3T3-L1 amb semicarbazida va provocar un augment de l'alliberament d'SSAO (figura 6, article 4). Tant l'activitat al medi de cultiu (230 ± 41 i 55 ± 39 pmol/h/placa en medis controls o tractats, respectivament) com la de membrana (282 ± 29 i 0,3 ± 0,1 pmol/min/mg de proteïna en homogenats controls o tractats, respectivament) es trobaven completament inhibides. Així doncs, sembla necessària la presència de l'activitat amino-oxidasa a la membrana o al medi de cultiu ja que l'absència provoca com a resposta un augment de la quantitat de proteïna alliberada. Aquest resultat suggereix que la forma soluble de l'SSAO pot tenir un paper fisiològic paracrí/autocrí en el metabolisme de l'adipòcit.

S'ha observat una correlació clara entre la quantitat d'SSAO present al medi de cultiu i l'activitat amino-oxidasa en aquest medi (figura 39), sigui quin sigui el tractament aplicat; la qual cosa ens indica que tota l'activitat amino-oxidasa del medi és SSAO.

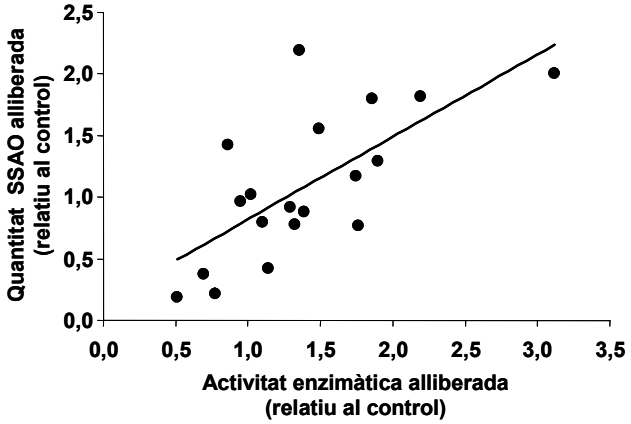


Figura 39. Correlació entre l'abundància d'SSAO al medi de cultiu de cèl·lules 3T3-L1 i l'activitat amino-oxidase present en aquests medis. S'hi representa la correlació entre l'abundància de l'SSAO al medi de cultiu determinada per transferència *Western blot* i expressada com la intensitat relativa al control de la banda corresponent al monòmer, i l'activitat SSAO present en aquests medis de cultiu referida a l'activitat control. El control és el medi, de cada sèrie d'experiments, que prové d'una placa que no ha estat tractada. La correlació és significativa r = 0,69 i $p < 0,001$.

V. DISCUSSIÓ

1. MECANISMES DE SENYALITZACIÓ IMPLICATS EN L'ACCIÓ DE LA BENZILAMINA I DEL VANADAT EN ELS ADIPÒCITS

Una qüestió crítica en el mecanisme d'estimulació de la translocació del transportador GLUT4 a la membrana dels adipòcits de rata o dels adipòcits 3T3-L1 era la naturalesa de la molècula activa generada per la catàlisi de l'SSAO en presència de vanadat. En la via estimulada, no s'observa una activació marcada del receptor de la insulina, cosa que suggereix que l'inici d'aquesta via és diferent al de la via estimulada per la insulina. L'estimulació per benzilamina i vanadat es caracteritza per un increment en el nivell de fosforilació de proteïnes als residus de tirosina. L'estudi de l'activitat proteïna tirosina-fosfatasa dels adipòcits en presència de benzilamina i vanadat, suggereix que la via passa inicialment per la inhibició de proteïnes tirosina-fosfatasa, en lloc de passar per l'activació d'una proteïna tirosina-quinasa. En aquest sentit, diverses evidències suggereixen que el peroxovanadat és el missatger format per la catàlisi de l'SSAO en presència de benzilamina i vanadat:

1. En homogenats de teixit adipós de rates diabètiques per estreptozotocina tractades crònicament amb benzilamina i vanadat, s'observà un augment de les proteïnes fosforilades en tirosina i una disminució de l'activitat fosfatasa (figura 31 dels resultats).
2. La incubació d'adipòcits aïllats de rata amb benzilamina i vanadat augmentà la fosforilació en tirosines de manera semblant a la fosforilació causada per la incubació amb peroxovanadat (figura 5 B, article 3).
3. L'activitat proteïna tirosina-fosfatasa en homogenats d'adipòcits incubats amb benzilamina i vanadat o peroxovanadat disminuí d'una manera semblant (figura 5 C, article 3).
4. La incubació d'SSAO recombinant humana amb benzilamina i vanadat generà mono- i tri-peroxovanadat, que es detectaren per ressonància magnètica nuclear (RMN) (figura 5 A, article 3).

A la via d'estimulació del transport de glucosa es dóna un equilibri entre les proteïnes tirosina-quinasa i les proteïnes tirosina-fosfatasa. En el cas de l'activació del transport per la insulina, a l'inici s'activen proteïnes-quinasa, com és el mateix receptor de la insulina; la mateixa via activa posteriorment proteïnes tirosina-fosfatasa que la inactiven (Goldstein *et al.*, 2000) (vegeu el punt 1.1.2. de la introducció i el punt 1.3. de la discussió). Les dades presentades suggereixen que l'activitat SSAO genera, en presència dels seus substrats i de vanadat, peroxovanadat, un inhibidor irreversible de proteïnes tirosina-fosfatasa, i s'augmenta la fosforilació de tirosines de la cèl·lula adiposa; així, s'observa l'activació parcial de l'activitat quinasa del receptor de la insulina i l'activació potent d'IRS-1 i IRS-3. L'IRS-3 està implicat a la via de senyalització de la insulina en absència d'IRS-1 (Kaburagi *et al.*, 1997) i és el principal IRS fosforilat a la via de senyalització de l'SSAO. La fosforilació de tirosines, o l'absència de

desfosforilació dels substrats del receptor de la insulina, provoca l'activació de la PI3K a través de la interacció de p85 i els IRS, i posteriorment activa la PKB (article 1). Proposem que l'activació d'aquestes molècules de la via de senyalització per la combinació de substrats de l'SSAO i vanadat causa el reclutament de GLUT4 a la membrana plasmàtica i estimula el transport de glucosa en els adipòcits (figura 1).

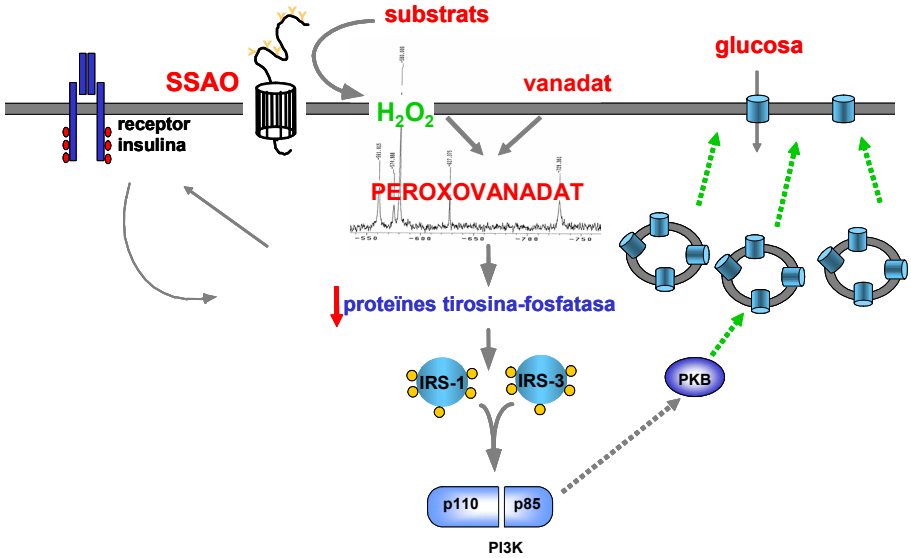


Figura 1. Estimulació del transport de glucosa per substrats de l'SSAO

El fet que la combinació de benzilamina i vanadat estimuli la translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica i activi el transport de glucosa en adipòcits a través de la producció de peroxovanadat està en concordança amb observacions prèvies on es mostrà que: *a*) el peròxid d'hidrogen és un element crucial per tal que es produeixin els efectes observats ja que la catalasa els bloqueja (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998); *b*) el peroxovanadat és un potent agent mimetitzador de l'acció de la insulina (Fantus *et al.*, 1989; Lonnroth *et al.*, 1993; Posner *et al.*, 1994).

Existeixen, però, dificultats per atribuir els efectes dels substrats de l'SSAO només a la formació de compostos de peroxovanadat ja que: *a*) el peroxovanadat, al contrari que el vanadat (Green, 1986; Mooney *et al.*, 1989), activa fortament l'activitat proteïna tirosina-quinasa del receptor de la insulina en adipòcits de rata (Kadota *et al.*, 1987; Shisheva and Shechter, 1993a) i la combinació de benzilamina i vanadat causa una estimulació modesta de l'activitat quinasa del receptor assajat com a nivell de fosforilació de les tirosines (figura 3, article 1); *b*) la insulina i el peroxovanadat tenen efectes additius sobre el transport de glucosa en adipòcits aïllats de rata (Shisheva and Shechter, 1993a) i, en el nostre cas, no s'observen efectes additius en el transport de glucosa en presència d'insulina i de benzilamina i vanadat (article 1). Els efectes additiuses es donen, però, a concentracions de peroxovanadat superiors a 20 μM; en el nostre cas, donada la producció *in situ* per l'activitat SSAO, l'absència d'additivitat es pot justificar pel fet que el peroxovanadat produït no arribi a aquesta dosi. De fet, s'ha descrit que en adipòcits aïllats amb 1 mM de tiramina es pot generar una concentració de 40 μM de H_2O_2

(Marti *et al.*, 1998); en el nostre cas, estem treballant amb 100 μM de benzilamina i segurament no superarem els 4 μM de H_2O_2 després dels 45 minuts d'incubació.

2. EFECTES *IN VIVO* DE L'ADMINISTRACIÓ DE BENZILAMINA I VANADAT

2.1. EFECTES SOBRE EL METABOLISME GLUCÍDIC

La taula 1 resumeix els efectes observats pel tractament agut i crònic amb benzilamina i vanadat de rates diabètiques per estreptozotocina (diabetis de tipus 1) i de rates Goto-Kakizaki (diabetis de tipus 2), i es destaquen les diferències observades entre els dos models. Tots els efectes s'han observat només en cas que s'hagi administrat la benzilamina i el vanadat conjuntament i no si s'ha administrat només una de les dues molècules per separat.

Taula 1. Efecte agut i crònic de la benzilamina i el vanadat en dos models de rates diabètiques.

	STZ (diabetis de tipus 1)	GK (diabetis de tipus 2)
Millora en la tolerància a la glucosa	sí (42%)	sí (47%)
Secreció d'insulina	**cap efecte**	**augmentat**
Normalització de la glucèmia	sí	sí
Transport basal de glucosa als adipòcits	augmentat	augmentat
Transport de glucosa estimulat per insulina als adipòcits	**augmentat**	**cap efecte**
Quantitat de GLUT4 als adipòcits	**augmentat**	**cap efecte**
Quantitat de GLUT4 a la membrana plasmàtica dels adipòcits	-	augmentat
Transport basal de glucosa al múscul	-	cap efecte
Transport de glucosa estimulat per insulina al múscul	-	augmentat
Quantitat de GLUT4 al múscul	cap efecte	cap efecte

La tolerància a la glucosa es va veure millorada en un 42% a les rates diabètiques per estreptozotocina i en un 47% a les rates Goto-Kakizaki (figura 2, article 2 i figura 1 B i C, article 3). En aquest darrer model, la millora de la tolerància a la glucosa anava associada a una recuperació de la primera fase de la secreció de la insulina (figura 4, article 3), mentre que en el cas de les rates diabètiques per estreptozotocina no es van observar canvis a la secreció d'insulina (taula 3, article 2), la qual cosa era d'esperar a causa de la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques per l'estreptozotocina durant l'establiment de la diabetis.

Les dades sobre la secreció d'insulina ens suggereixen que els efectes de la benzilamina i del vanadat administrats de manera aguda en rates diabètiques per estreptozotocina són mimetitzadors de la insulina. En el cas de les rates Goto-Kakizaki, en canvi, a causa de

l'augment de la insulina circulant, la millora en la tolerància podria ser deguda a efectes insulinomimètics, però també a una sensibilització dels teixits perifèrics a aquesta insulina o a l'increment de la secreció insulínica.

Pel que fa als efectes crònics van començar a aparèixer una setmana després d'haver-se iniciat el tractament, tant en les rates diabètiques per estreptozotocina com en les rates Goto-Kakizaki, (figura 3, article 2 i figura 2 A, article 3), en concordança amb el que ja s'havia observat amb vanadat o peroxovanadat (Meyerovitch *et al.*, 1987; Yale *et al.*, 1995). En el cas de les rates diabètiques per estreptozotocina, en presentar-se glucèmies més elevades, van ser necessàries dosis de vanadat també més elevades. Amb els tractaments crònics no es van observar canvis en els nivells d'insulina en circulació, en cap dels dos models, de manera que les rates estreptozotocina es van mantenir hipoinsulinèmiques i les Goto-Kakizaki, hiperinsulinèmiques.

2.2. EFECTES DEL TRACTAMENT CRÒNIC AMB BENZILAMINA I VANADAT SOBRE ELS TEIXITS PERIFÈRICS

Un cop finalitzats els tractaments crònics, es va procedir a l'anàlisi de l'estat metabòlic del teixit adipós i del múscul esquelètic dels animals, per tal d'establir el possible mecanisme pel qual es produïa la normalització de la glucèmia observada i quins eren els teixits implicats.

2.2.1. EFECTES DEL TRACTAMENT CRÒNIC SOBRE TEIXIT ADIPÓS

L'estudi del transport de glucosa estimulat per insulina en adipòcits aïllats de rates diabètiques per estreptozotocina o en rates Goto-Kakizaki no tractades va mostrar que presentaven resistència a la insulina (figura 5 dels resultats i figura 1 A, article 3). En el cas de les rates Goto-Kakizaki, només s'observa resistència quan s'utilitzen concentracions submàximes d'insulina; aquesta observació pot justificar la moderada hiperglucèmia que els animals presenten, possiblement compensada per la moderada hiperinsulinèmia observada. En ambdós models, es va observar que la combinació de benzilamina i vanadat era capaç d'estimular el transport de glucosa fins als nivells de rates no diabètiques, és a dir, que no es presentava resistència a aquestes molècules. Aquest fet és interessant ja que ens trobem davant de compostos que són capaços d'estimular el transport de glucosa de manera semblant en animals no diabètics i diabètics sense que s'observi resistència. La resistència a la insulina característica de la diabetis és un dels principals problemes per als tractaments amb insulina que existeixen actualment. A més a més, mentre que en adipòcits aïllats d'animals no diabètics l'estimulació del transport de glucosa per part de la benzilamina i del vanadat és el 70-80% de l'efecte màxim produït per la insulina, en adipòcits aïllats dels animals diabètics els dos transports són comparables.

L'estudi del transport de glucosa en adipòcits aïllats de rates que havien estat tractades crònicament amb benzilamina i vanadat va mostrar que el transport basal de glucosa havia augmentat en els dos models de rates diabètiques (figura 4, article 2 A i figura 22 dels resultats). Aquest augment del transport basal podria contribuir a la millora en la glucèmia observada *in vivo*.

Es va observar que el transport de glucosa estimulat per insulina augmentava en rates diabètiques per estreptozotocina tractades, mentre que no variava en les rates Goto-Kakizaki tractades (figura 4 A, article 2 i figura 22 dels resultats). També es va observar un augment del transport de glucosa estimulat per benzilamina i vanadat a les rates diabètiques per estreptozotocina (figura 15 dels resultats). Així doncs, postulem que en aquestes rates s'està donant una sensibilització del teixit adipós a estímuls posteriors, ja siguin per la insulina o per altres molècules com ara la benzilamina i el vanadat; aquesta sensibilització contribuiria a la normoglucèmia observada, ja que, després del tractament, el teixit adipós estarà més sensibilitzat a la poca insulina circulant que hi ha. El fet que també hi hagi un augment del transport basal suggereix que també es poden estar donant efectes insulinomimètics de la combinació de benzilamina i vanadat. Així, a les rates diabètiques per estreptozotocina s'observaven efectes insulinomimètics en l'administració aguda, mentre que en el tractament crònic apareixien tant efectes insulinomimètics com insulinosensibilitzadors sobre el teixit adipós. En les rates Goto-Kakizaki, no es van observar efectes insulinosensibilitzadors a nivell de teixit adipós, però sí d'insulinomimètics sobre el transport basal.

Pel que fa al nivell de transportadors de glucosa en adipòcits no es van observar canvis en la quantitat de GLUT1 a les rates diabètiques per estreptozotocina (figura 13 dels resultats), però sí que s'hi va observar un augment de la quantitat total de GLUT4 (figura 5, article 2). De fet, les rates diabètiques per estreptozotocina presenten disminucions d'aquest transportador quan se'n compara l'abundància total amb rates no diabètiques (Sivitz *et al.*, 1992); així doncs, el tractament provoca una recuperació del nivell de transportador GLUT4. Aquesta recuperació ens pot explicar, d'una banda, l'augment del transport basal, en cas que una part d'aquest transportador es trobi permanentment a la membrana plasmàtica, de fet, existeix una correlació entre el nivell de transportador i el transport basal (figura 14 dels resultats). D'altra banda, la recuperació del nivell de GLUT4 pot explicar la sensibilització a la insulina o a altres molècules com ara la benzilamina i el vanadat, que provoquen la translocació del *pool* augmentat d'aquest transportador a la membrana plasmàtica.

En el cas de les rates Goto-Kakizaki, no es va observar cap canvi en l'abundància total de GLUT1 o GLUT4 als adipòcits; de fet, aquestes rates presenten nivells normals de transportadors (Kanoh *et al.*, 2000) (figura 23 dels resultats). Tot i això, es va observar un augment en la quantitat de GLUT4 present a la membrana plasmàtica en situació basal en les rates que havien estat tractades crònicament amb benzilamina i vanadat (figura 2 C, article 3).

L'abundància de GLUT4 a la membrana plasmàtica en situació basal es correlaciona amb el transport basal de glucosa, fet que ens suggereix que l'augment del transportador és el responsable de l'augment del transport basal observat. L'absència de canvis en la quantitat total de GLUT4 pot explicar la manca d'efectes de la insulina sobre el transport de glucosa en aquestes rates.

En el cas de les rates diabètiques per estreptozotocina, es va observar que aquells animals que havien estat tractats amb benzilamina i vanadat recuperaven part del teixit adipós que havien perdut amb l'establiment de la diabetis (taula 4, article 2 i figura 10 dels resultats). La funció biològica de l'SSAO al teixit adipós no es coneix, però a causa d'aquests resultats i d'altres que indiquen que SSAO actua com una proteïna d'adhesió en cèl·lules endotelials (Bono *et al.*, 1998a; Smith *et al.*, 1998), proposem que l'SSAO podria exercir una doble funció a les cèl·lules adiposes: d'una banda, regularia processos anabòlics del metabolisme i, de l'altra, podria controlar la interacció entre les cèl·lules o entre aquestes i la matriu extracel·lular, intervenint en el procés adipogènic (diferenciació i maduració dels adipòcits).

En aquest sentit, s'ha descrit que els substrats de l'SSAO poden mimetitzar altres efectes de la insulina. Estudis recents han implicat l'SSAO i els seus substrats en la diferenciació adipocitària; així, el tractament de preadipòcits 3T3-F442A amb benzilamina i vanadat durant una setmana provoca l'adquisició de la morfologia adipocitària, l'estimulació de la síntesi proteica, l'acumulació de triacilglicerol i l'aparició de diversos marcadors de conversió adipocitària (Fontana *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2001). Així mateix, s'ha descrit que els substrats de l'SSAO poden mimetitzar els efectes antilipolítics de la insulina en els adipòcits humans (Morin *et al.*, 2001) la qual cosa implica l'SSAO en el procés de maduració dels adipòcits. Així doncs, els efectes insulinomimètics dels substrats de l'SSAO en l'estimulació del procés adipogènic i la inhibició de la lipòlisi poden provocar un augment de massa adiposa i podrien explicar la recuperació del teixit adipós epididimal observat en aquests animals.

2.2.2. EFECTES DEL TRACTAMENT CRÒNIC SOBRE MÚSCUL

Com ja s'ha comentat reiteradament, el múscul és el teixit que consumeix la majoria de la glucosa circulant en estat absortiu (DeFronzo *et al.*, 1981) i, per tant, és difícil pensar que la normalització de la glucèmia observada en els dos models de diabetis no passi, en part, per ell. A més a més, en ambdós models s'ha descrit resistència a la insulina en aquest teixit (Krook *et al.*, 1997; Wallberg-Henriksson and Hollozy, 1985) (figura 2 D, article 3).

En el model de rates diabètiques per estreptozotocina només es va estudiar la quantitat total de transportadors GLUT1 i GLUT4 en múscul *soleus* i EDL. Tot i estar descrites disminucions de la quantitat de GLUT4 en aquests músculs amb l'establiment de la diabetis (Richardson *et al.*, 1991), el tractament amb benzilamina i vanadat no va provocar canvis en l'expressió dels transportadors estudiats (figura 16 dels resultats). Malgrat que és possible que el tractament crònic augmenti el transport i la utilització de glucosa al múscul, aquest aspecte no ha estat estudiat.

A les rates Goto-Kakizaki, es va realitzar un estudi més ampli de l'estat metabòlic del múscul. El múscul d'aquestes rates presenta una clara resistència a la insulina (Song *et al.*, 1999) (figura 2 C, article 3); el tractament crònic amb benzilamina i vanadat va provocar una reversió de la resistència a la insulina del múscul, de manera que es van obtenir transports de glucosa comparables als de les rates no diabètiques (figura 2 D, article 3). L'anàlisi de l'abundància de transportadors de glucosa al múscul *soleus* va mostrar que no hi havia canvis en la quantitat total de GLUT4 i que hi havia un augment en la quantitat de GLUT1 total en les rates que havien estat tractades només amb vanadat o amb benzilamina i vanadat (figura 25 dels resultats). L'augment de GLUT1 observat en membranes totals no es correlaciona amb un augment en el transport basal, fet que suggereix que aquest GLUT1 podria no ser actiu o no trobar-se a la membrana plasmàtica. Les dades de transport de glucosa al múscul ens suggereixen que el tractament crònic amb benzilamina i vanadat ha provocat una sensibilització a la insulina en aquest teixit, ja que només se n'observaren els efectes en presència de l'hormona i no en situació basal.

Així doncs, en el cas de les rates Goto-Kakizaki, tant l'augment del transport basal als adipòcits com la sensibilització a la insulina que es dóna al múscul i que porta associat un augment del transport de glucosa semblen ser responsables de la normalització de la glucèmia observada en els animals tractats crònicament amb benzilamina i vanadat.

L'obtenció d'aquests resultats ens va fer buscar quin podia ser el mecanisme pel qual es donen els efectes observats. Com que en el múscul esquelètic no s'expressa l'SSAO, semblava difícil pensar en efectes directes de la combinació de benzilamina i vanadat sobre ell;

en aquest sentit, s'observa que la benzilamina i el vanadat no estimulen el transport de glucosa al múscul (figura 3 B i C, article 3). Donada la importància cada cop més palesa del teixit adipós en el control de l'homeòstasi glucídica de l'organisme (Abel *et al.*, 2001), i el seu paper com a òrgan endocrí (revisat a Steppan and Lazar, 2002), que l'implica en fenòmens de resistència a la insulina en múscul i fetge (vegeu el punt 1.2. de la introducció), ens vam plantejar la possibilitat que el teixit adipós secretés una adipocitocina o algun factor que afectés al múscul veí. Aquesta hipòtesi té sentit ja que s'observa una estimulació del transport de glucosa al múscul quan s'administra prèviament benzilamina i vanadat a l'animal (figura 3 A, article 3).

La possibilitat de la secreció d'una adipocitocina es va testar analitzant per PCR en temps real els nivells d'expressió de diverses adipocitocines en teixit adipós (figura 28 dels resultats). No es va obtenir cap correlació entre la millora de la glucèmia de les rates Goto-Kakizaki tractades crònicament i els nivells de les adipocitocines estudiades. Igualment es va descartar que variacions en els nivells de triglicèrids o d'àcids grassos lliures en circulació fossin les responsables d'afectar el metabolisme glucídic del múscul (figura 29 dels resultats).

En una altra aproximació per tal de determinar el possible efecte del teixit adipós sobre el múscul esquelètic, es va analitzar si era un molècula generada ràpidament al teixit adipós, després de l'oxidació de la benzilamina per l'SSAO, la que estava afectant el múscul; en aquest sentit, es van realitzar experiments de coincubació d'explants de teixit adipós i *strips* de múscul *soleus*. Aquests experiments van demostrar que hi havia una estimulació del transport de glucosa al múscul en presència de benzilamina, vanadat i teixit adipós i que depenia de l'activitat SSAO (figura 3 B, article 3). A més a més, estudis amb la proteïna SSAO recombinant humana van demostrar que l'activitat SSAO sola, sense la resta de la cèl·lula adiposa, era suficient per a l'estimulació del transport de glucosa al múscul (figura 3 C, article 3). La molècula generada al teixit adipós i que afecta el transport de glucosa al múscul podria ser el peroxovanadat, ja que aquest es produeix en presència d'SSAO, benzilamina i vanadat (assajat per RMN, figura 5 A, article 3) i presenta efectes insulinomimètics al múscul esquelètic (Tsiani *et al.*, 1998).

Els efectes aguts observats al múscul són efectes insulinomimètics i no de sensibilització a la insulina com passava amb els músculs de les rates Goto-Kakizaki després del tractament crònic, ja que les coincubacions no es fan en presència d'insulina. Ara bé, no són efectes insulinomimètics de la benzilamina i el vanadat directament sobre el múscul sinó de la molècula generada al teixit adipós; és a dir, probablement, del peroxovanadat. Aquestes diferències es poden explicar, ja que en el cas de les rates Goto-Kakizaki hi havia un defecte previ de resistència que amb el tractament es millora; en canvi, en les coincubacions s'utilitzen músculs de rates no diabètiques que no presenten defectes de sensibilitat a la insulina.

2.2.3. EFECTES DEL TRACTAMENT CRÒNIC EN CÈL·LULES β

A causa dels efectes observats després del test de la tolerància a la glucosa en rates Goto-Kakizaki sobre els nivells d'insulina plasmàtica, es van estudiar els possibles efectes directes de la combinació de benzilamina i vanadat sobre l'illot pancreàtic. Tot i que l'illot pancreàtic expressa SSAO (figura 4 E, article 3), l'activitat SSAO present en aquest és molt petita (taula 4 dels resultats). Malgrat això, i al contrari dels resultats obtinguts en múscul esquelètic, es van observar efectes directes de la combinació de benzilamina i vanadat sobre la secreció d'insulina d'illots provinents de rates Goto-Kakizaki (figura 4 D, article 3).

Pel que fa a l'efecte del peroxovanadat sobre l'illot pancreàtic, s'ha descrit que aquest estimula la secreció d'insulina a baixes concentracions de glucosa, però que la inhibeix a altres concentracions de glucosa (Gogg *et al.*, 2001). En el nostre cas és dubtós que els efectes observats *in vitro* siguin deguts a la producció de peroxovanadat, donada la baixa activitat SSAO que presenta l'illot; ara bé, en cas que se'n produís, cal tenir en compte que els efectes només s'observen als illots de rates Goto-Kakizaki els quals tenen alterada la secreció d'insulina i no en el cas d'illots de rates *Wistar*. El peroxovanadat, igual que en altres teixits, afecta el nivell de fosforilació de la cèl·lula β (Gogg *et al.*,2001), de manera que en el cas de les rates Goto-Kakizaki podria estar compensant alteracions en la fosforilació en aquestes cèl·lules. No es coneix el mecanisme exacte pel qual es dóna la secreció deficient d'insulina als illots de les rates Goto-Kakizaki, però s'ha observat una davallada de la ràtio ATP/ADP implicada en l'alliberament de la insulina (Abdel-Halim *et al.*, 1996) deguda a un augment en l'activitat glucosa-6-fosfatasa (Ling *et al.*, 2001), i hi ha autors que han proposat la davallada de la fosforilació de proteïnes implicades en la secreció com un altre dels mecanismes responsables. En aquest sentit, s'han descrit augments en l'expressió de la proteïna tirosina-fosfatasa σ (PTPσ o LAR-PTP2) als illots d'aquestes rates (Ostenson *et al.*, 2002); així doncs els efectes observats podrien passar a través de la inhibició d'aquesta proteïna tirosina-fosfatasa pel peroxovanadat format. Els efectes observats *in vivo* sobre la secreció d'insulina podrien ser deguts a la producció de peroxovanadat per part del pàncrees o del teixit adipós proper a aquest (vegeu l'apartat següent).

2.3. MODEL DELS EFECTES CEL·LULARS DE L'SSAO/VAP-1 EN L'HOMEÒSTASI GLUCÍDICA

Els resultats obtinguts *in vivo* i *in vitro* per acció de la combinació de benzilamina i vanadat ens porten a postular un model on la benzilamina, en reaccionar amb l'SSAO del teixit adipós i en presència de vanadat, produirien peroxovanadat, el qual és capaç d'estimular el transport de glucosa a la pròpia cèl·lula adiposa (Fantus *et al.*, 1989), i al múscul esquelètic (Tsiani *et al.*, 1998), i la secreció d'insulina a l'illot pancrèatic (Gogg *et al.*, 2001). Així doncs, aquest tipus de combinació de fàrmacs permet la generació d'inhibidors de proteïnes tirosina-

fosfatasa de manera localitzada, com per exemple al teixit adipós, on poden realitzar una sèrie d'efectes locals i interactuar amb els teixits veïns, com ara el múscul esquelètic o el pàncrees. Aquest model està esquematitzat a la figura 2.

Els efectes de la benzilamina i el vanadat, així com els del peroxovanadat, sobre els diferents teixits, són tant insulinomimètics com insulinosensibilitzadors dependent del model animal de diabetis, l'administració aguda o crònica i el teixit afectat. A més a més, s'han observat efectes insulinosecretors de la combinació de benzilamina i vanadat en el cas dels illots pancreàtics.

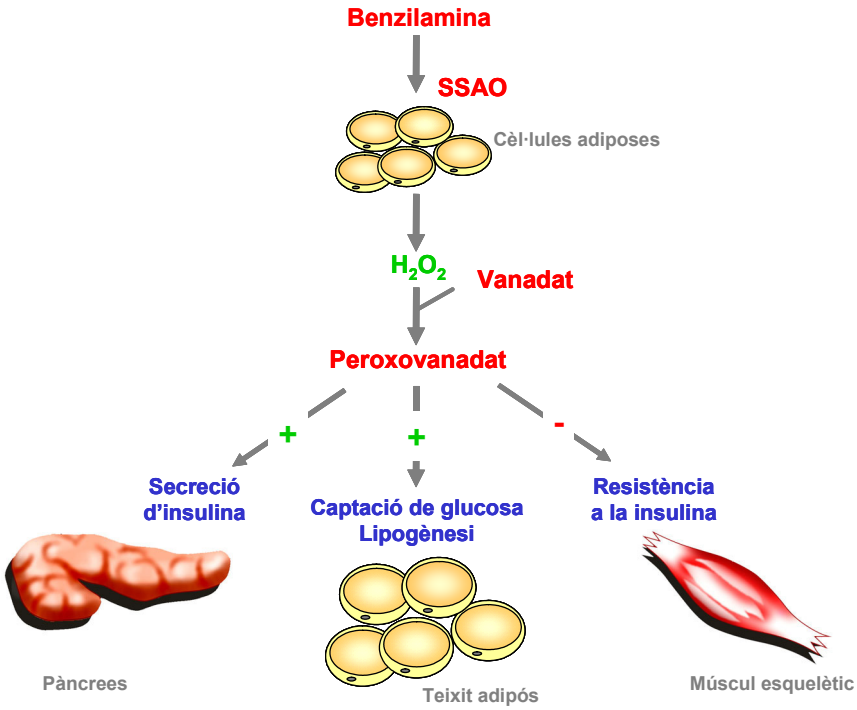


Figura 2. Model dels efectes cel·lulars de l'SSAO/VAP-1 en l'homeòstasi glucídica.

En el cas de les rates Goto-Kakizaki, per exemple, s'ha descrit un augment de l'activitat proteïna tirosina-fosfatasa-1B (PTP-1B) al múscul esquelètic (Dadke *et al.*, 2000); així doncs, la millora de la sensibilitat insulínica observada al múscul esquelètic després del tractament crònic amb benzilamina i vanadat podria passar per la inhibició d'aquesta activitat fosfatasa augmentada, pel peroxovanadat produït al teixit adipós proper al múscul esquelètic. Així mateix, en aquestes rates l'activitat proteïna-quinasa B (PKB) després de l'estimulació per insulina està disminuïda en un 68% respecte a la de rates *Wistar*, malgrat que l'expressió de proteïna és la mateixa (Krook *et al.*, 1997); aquestes dades ens suggereixen que la proteïna no s'està fosforilant correctament, possiblement a causa de l'augment de fosfatases al múscul esquelètic. Donada la recuperació de la sensibilitat insulínica observada després del tractament crònic amb benzilamina i vanadat, proposem que es podria donar una recuperació de l'activitat PKB després de l'estimulació amb insulina a les rates Goto-Kakizaki tractades. D'altra banda, ja hem comentat que en el cas de l'illot pancreàtic el peroxovanadat generat al teixit adipós de les

proximitats del pàncrees podria inhibir la PTPσ augmentada, de manera que s'estimularia la secreció d'insulina.

Un altre teixit que té un paper molt important en el balanç glucídic és el fetge; el metabolisme glucídic en el fetge no s'ha estudiat en el decurs aquesta tesi, però no es descarta que alguns dels efectes observats *in vivo* puguin passar per ell, ja que s'han descrit activacions del receptor de la insulina per peroxovanadat en hepatòcits (Posner *et al.*, 1994). Per demostrar-ne o descartar-ne la implicació, caldrà fer estudis en aquest teixit.

2.3.1. AVANTATGES DE LA PRODUCCIÓ *IN SITU* DE PEROXOVANADAT PER L'SSAO

La generació de peroxovanadat *in situ*, principalment al teixit adipós, és avantatjosa davant de l'administració exògena ja que és una molècula molt reactiva; així doncs, en ser produïda al lloc o a les proximitats d'on ha de ser actiu s'eviten possibles interaccions en altres indrets, la qual cosa podria portar una toxicitat associada. D'altra banda, a causa de la seva elevada reactivitat, cal administrar dosis molt elevades perquè una part arribi als teixits diana; l'administració de molècules precursores de peroxovanadat permet la utilització de dosis molt més baixes.

La producció de peroxovanadat observada ens porta a suggerir que el producte de la reacció catalitzada per l'SSAO implicat en els efectes sobre el metabolisme glucídic és el H_2O_2 i no l'aldehid. El fet que altres substrats de l'SSAO, a part de la benzilamina, tinguin efectes biològics semblants, afavoreix aquesta idea:

1. Altres substrats com lara a tiramina, la metilamina, la *N*-decilamina, la β-feniletilamina, la histamina i la *N*-acetilputrescina estimulen el transport de glucosa en combinació de vanadat en adipòcits aïllats de rata (taula 1, article 1) o sols en adipòcits humans (Morin *et al.*, 2001).
2. La incubació crònica en presència de benzilamina, tiramina, metilamina o β-feniletilamina estimula la diferenciació adipocitària de preadipòcits 3T3-F442A o 3T3-L1 (Fontana *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2001).
3. L'administració aguda de tiramina augmenta la utilització de glucosa assajada pel test de tolerància a la glucosa en rates diabètiques per estreptozotocina, i aquest efecte és bloquejat per semicarbazida (Morin *et al.*, 2002).
4. L'administració crònica durant dues setmanes de tiramina i vanadat augmenta la utilització de glucosa assajada pel test de tolerància a la glucosa en rates diabètiques per la estreptozotocina (Morin *et al.*, 2002).

Una qüestió crítica per a l'aplicabilitat d'aquest tractament a la patologia diabètica és la toxicitat que pot portar associada. En aquest sentit, la metabolització d'amines per l'SSAO

produeix peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i l'adheid corresponent, productes biològicament actius. D'altra banda, l'altra molècula administrada, el vanadat, no s'ha desenvolupat com a fàrmac antidiabètic, malgrat les seves propietats insulinomimètiques (vegeu el punt 1.3. de la introducció), a causa de la seva toxicitat. Ara bé, el tractament que proposem es basa en la utilització de dosis que no sembla que siguin tòxiques.

El H_2O_2, una espècie reactiva d'oxigen, tot i ser tòxica a concentracions elevades, a baixes concentracions actua com a missatger intracel·lular i està implicat en la transducció del senyal de la insulina (vegeu el punt 1.1.4. de la introducció). A causa de les baixes concentracions de peròxid d'hidrogen produïdes per l'SSAO, comparables a les produïdes per la NADPH-oxidasa després de l'acció de la insulina (Krieger-Brauer and Kather, 1992), proposem que el H_2O_2 podria actuarar com a missatger intracel·lular o reaccionar amb el vanadat administrat i no es comportaria com a agent oxidant. Així mateix, tot i les evidències que impliquen el H_2O_2 en l'augment de l'adhesió dels limfòcits a les cèl·lules endotelials (Johnston *et al.*, 1996) assajos en cambra de flux on s'ha afegit H_2O_2 a concentracions comparables a les produïdes per l'SSAO demostren que el rodament (*rolling*) dels limfòcits sobre cèl·lules endotelials no està afectat (Salmi *et al.*, 2001). El H_2O_2 ha estat també implicat en la regulació de l'SSAO; així, el H_2O_2 producte de la reacció pot produir una inhibició de l'SSAO de sèrum boví (Pietrangeli *et al.*, 2000).

Quant a l'aldehid format, s'ha suggerit la implicació de l'SSAO en diferents patologies vasculars. L'oxidació de la metilamina, possible substrat endogen de l'enzim, porta a la formació de formaldehid, un agent molt reactiu que ha estat relacionat amb patologies vasculars associades a la diabetis (vegeu el punt 2.3.1. de la introducció). L'administració de benzilamina podria competir amb la metilamina per l'SSAO formant-se benzaldehid, un aldehid menys tòxic que el formaldehid. Això pot ser d'especial interès en la patologia diabètica, on s'han descrit tant augments de la forma circulant de l'SSAO com de la quantitat de formaldehid excretat per l'orina (Deng and Yu, 1999); així doncs, el tractament amb benzilamina i vanadat, d'una banda, estaria produint peroxovanadat amb acció insulinomimètica o insulinosensibilitzadora, i d'altra banda, podria evitar l'elevada producció de formaldehid que contribueix a les patologies vasculars associades a la diabetis. En aquest sentit, proposem que l'administració d'amines exògenes podria representar una estratègia per evitar la formació de formaldehid durant la patologia diabètica.

Pel que fa a l'administració de vanadat, l'administració combinada amb la benzilamina provoca la formació de peroxovanadat, un altre compost insulinomimètic més potent que el vanadat (Fantus *et al.*, 1989); així doncs, amb l'ús de dosis més baixes i, per tant, no tòxiques, s'aconsegueix el mateix efecte insulinomimètic. L'elevada potència del peroxovanadat com a agent insulinomimètic ve donada pel seu mecanisme d'acció: el vanadat actua com un anàleg del fosfat, ocupa el centre actiu de les proteïnes tirosina-fosfatasa i, per tant, es comportant com un inhibidor reversible. El peroxovanadat, en canvi, és un inhibidor irreversible, perquè

oxida la cisteïna crítica del centre catalític d'aquests enzims (Huyer *et al.*, 1997).

En animals, el vanadat s'ha administrat sovint en l'aigua de beguda i és efectiu a una dosi d'entre 0,15 i 1 mg/ml; la dosi de 0,15 mg/ml de metavanadat sòdic a l'aigua de beguda és la més baixa efectiva en la reducció de la glucèmia en rates diabètiques per estreptozotocina (Domingo *et al.*, 1995). Les dosis usades porten associades diarrea i una baixada en el consum de beguda i menjar i, en conseqüència, deshidratació i pèrdua de pes. Aquests efectes es poden evitar afegint NaCl a l'aigua de beguda i corregint-ne el seu pH cap a la neutralitat. A part d'aquestes lesions gastrointestinals s'han observat altres efectes tòxics que no s'han pogut corregir, deguts principalment a l'acumulació del vanadat al teixits entre els quals destaquen efectes hepatotòxics, nefrotòxics, teratogènics i efectes greus en el desenvolupament del fetus (revisat a Srivastava, 2000). L'administració d'agents quelants en combinació amb el vanadat en disminueix l'acumulació als teixits i fa baixar els seus efectes tòxics sense disminuir-ne l'efecte hipoglucemiant (Domingo *et al.*, 1993). En el cas de l'administració intraperitoneal de vanadat, que és la via que hem usat en els tractaments crònics, es parla d'una LD_{50} per al metavanadat sòdic en rates de 18,4 mg/kg/dia, cosa que equival a 7,7 mg vanadi/kg/dia (Llobet and Domingo, 1984). En el nostre cas, en el tractament crònic, s'han usat dosis de 4,6 o 9,2 mg/kg/dia (25 o 50 μmol/kg/dia) d'ortovanadat sòdic durant dues setmanes, que corresponen a 1,3 i 2,6 mg vanadi/kg/dia, respectivament i durant els estudis aguts de test de tolerància a la glucosa s'ha usat una única dosi intravenosa d'ortovanadat sòdic de 3,7 mg/kg (20 μmol/kg), que equival a 1 mg vanadi/kg; totes aquestes dosis no són efectives per elles mateixes. A més a més, en els tractaments amb vanadat que porten associada toxicitat i mort d'animals s'observa, com ja he comentat, una disminució en el consum de menjar i beguda dels animals (Domingo *et al.*, 1995). En el nostre cas, es va fer el seguiment del consum de menjar i beguda durant el tractament crònic de les rates diabètiques per estreptozotocina: tot i detectar-se una disminució en rates que rebien la combinació de benzilamina i vanadat, aquelles que només rebien el vanadat van mantenir nivells elevats de consum, de manera que la reducció no és deguda a efectes tòxics sinó a la millora de l'estat diabètic.

Hi ha espècies en què no cal l'addició de vanadat per observar els efectes insulinomimètics de l'SSAO. Com que el H_2O_2 és també un agent insulinomimètic (Czech *et al.*, 1974; Taylor and Halperin, 1979), encara que menys potent que el peroxovanadat, si es produeix en quantitats prou elevades o no és destoxificat prou ràpidament podria presentar efectes per ell mateix sense la necessitat de l'addició del vanadat. Per exemple, en el cas de la rata, en què els adipòcits presenten uns sistemes de destoxificació d'espècies reactives d'oxigen molt actius, la benzilamina i la tiramina només són capaces d'estimular el transport de glucosa en presència de vanadat (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998). *In vivo*, en canvi, mentre que per observar efectes sobre la tolerància a la glucosa amb benzilamina cal afegir vanadat (article 2), amb la tiramina s'observen efectes per ella mateixa (Morin *et al.*, 2002). Com que la tiramina també es metabolitza per la MAO, es dóna una producció elevada

de H_2O_2 com a resultat de l'acció de les dues activitats amino-oxidasa, i es presenten els efectes sense la necessitat d'afegir vanadat. En humans, en canvi, s'observa l'estimulació del transport de glucosa en adipòcits aïllats tan sols en presència de diferents substrats de l'SSAO, sense que sigui necessària l'addició de vanadat (Morin *et al.*, 2001). De fet, els adipòcits humans presenten una activitat SSAO molt elevada (Vmax = 6,6 *versus* 0,4-1,6 nmol de benzilamina / mg de proteïna / min humà i ratolí, conill o porc, respectivament) (Raimondi *et al.*, 1992; Morin *et al.*, 2001) i segurament s'assoliran concentracions més elevades de H_2O_2, i possiblement efectives per elles mateixes, que en rates.

Els efectes biològics de la benzilamina i el vanadat requereixen l'activitat SSAO. Les evidències experimentals que ens porten a aquesta conclusió són les següents:

1. Els efectes de la benzilamina i el vanadat en el transport de glucosa en adipòcits aïllats es bloquegen per semicarbazida (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998).
2. Els efectes aguts de la benzilamina i el vanadat en la deposició de glucosa en rates no diabètiques o diabètiques per estreptozotocina es bloquegen pel tractament previ amb semicarbazida (figura 2 B, article 2 i figura 6 C dels resultats).
3. Els efectes de la benzilamina i el vanadat sobre el transport de glucosa al múscul, en estudis de coincubació amb explants de teixit adipós, no es donen en presència de semicarbazida (figura 3 B, article 3).
4. Els efectes de la benzilamina i el vanadat sobre la secreció d'insulina als illots pancreàtics de rata tampoc no es donen en presència de semicarbazida (figura 4 D, article 3).
5. Els efectes de la benzilamina i el vanadat sobre la fosforilació de les tirosines de proteïnes i l'activació d'IRS-1 i IRS-3 als adipòcits no es donen en presència de semicarbazida (figura 1 dels resultats, figura 4, article 1 i figura 5 B, article 3).

Cal recordar, però, que la semicarbazida no és un inhibidor completament específic, per això continua sent interessant la cerca de nous inhibidors selectius i potents de l'SSAO. L'ús d'animals *knock out* per l'SSAO serà igualment interessant per determinar si els efectes observats passen per aquesta activitat. Així mateix, aquestes afirmacions es basen en l'ús de la benzilamina com a substrat; la benzilamina, tot i ser oxidada principalment per l'SSAO, és també substrat de la MAO B (revisat a Lyles, 1996). En el cas dels resultats obtinguts en adipòcits, gairebé podem afirmar que la benzilamina és oxidada només per l'SSAO, perquè els adipòcits expressen principalment MAO A i poca MAO B (Marti *et al.*, 1998). *In vivo*, en canvi, no podem descartar l'oxidació de la benzilamina per la MAO B; ara bé, l'absència d'estimulació observada en presència de semicarbazida ens indica que o bé la MAO B no contribueix als efectes observats o bé el H_2O_2 produït només per aquesta amino-oxidasa no és suficient per què es donguin efectes en el metabolisme glucídic. Quan s'utilitza tiramina *in vivo*, en canvi, pel fet de ser substrat de l'SSAO, la MAO A i la MAO B, els efectes sobre la tolerància a la glucosa

es poden inhibir tant amb semicarbazida com amb pargilina (Morin *et al.*, 2002), la qual cosa indica que cal la contribució dels dos tipus d'activitats amino-oxidasa perquè es produeixin els efectes. Així doncs, el desenvolupament de substrats específics per a cadascuna de les activitats oxidasa serà de gran utilitat per esbrinar la relativa contribució de cadascuna d'elles.

2.3.2. IMPORTÀNCIA DE LES PROTEÏNES TIROSINA-FOSFATASA

La generació de compostos de peroxovanadat és rellevant ja que, com ja s'ha comentat, inhibeixen proteïnes tirosina-fosfatasa implicades en la desfosforilació de proteïnes que acaben amb la senyalització produïda per la insulina (vegeu el punt 1.1.2. de la introducció). A més a més, l'alteració de l'activitat tirosina-fosfatasa, com ja s'ha descrit en el múscul esquelètic i els illots pancreàtics de rates Goto-Kakizaki, contribueix a l'estat de resistència a la insulina; així doncs, l'expressió de proteïnes tirosina-fosfatasa específiques, entre les quals es troben la proteïna-fosfatasa relacionada amb l'antigen de leucòcits (LAR, *leukocyte antigen-related phosphatase*), la proteïna tirosina-fosfatasa-1B (PTP-1B) i la fosfatasa homològa a src 2 (SHP2, *src-homology phosphatase 2*), està augmentada al múscul i teixit adipós d'humans i rosegadors obesos (Ahmad *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 1995; Ahmad and Goldstein, 1995b); així mateix, s'ha detectat un augment de PTP-1B i SHP2 al múscul de rates diabètiques (Ahmad and Goldstein, 1995a; Ahmad and Goldstein, 1995b).

La sobreexpressió de LAR al múscul causa resistència a la insulina la qual cosa porta associada hiperinsulinèmia i reducció de la deposició de glucosa global i de la captació de glucosa a múscul (Zabolotny *et al.*, 2001). Així mateix, la sobreexpressió de PTP-1B al teixit adipós redueix el transport de glucosa estimulat per insulina (Chen *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1997). Aquests resultats suggereixen que LAR o PTP-1B poden contribuir a la patogènesi de la resistència a la insulina. Un altre fet que indica que la inhibició de les proteïnes tirosina-fosfatasa pot tenir efectes beneficiosos, és l'evidència que els ratolins que no tenen PTP-1B (*knock out*) tenen un augment en la sensibilitat a la insulina i són resistents a desenvolupar obesitat induïda per una dieta rica en greixos (Elchebly *et al.*, 1999).

Totes aquestes dades suggereixen que els inhibidors de les activitats tirosina-fosfatasa poden ser beneficiosos en els casos de diabetis o resistència a la insulina. En aquest sentit, l'administració de benzilamina i vanadat amb la producció consegüent de peroxovanadat a les zones pròximes dels teixits diana pot constituir una bona teràpia. Cal ampliar, però, els estudis en aquest camp, per demostrar si l'administració de benzilamina i vanadat està efectivament actuant sobre alguna de les activitats tirosina-fosfatasa implicades en la resistència a la insulina i quina és aquesta; el fet que la inhibició fos generalitzada a totes les proteïnes tirosina-fosfatasa seria un punt en contra del tractament, ja que la inespecificitat pot portar efectes tòxics associats. En aquest sentit, s'han descrit efectes tòxics de compostos de peroxovanadat en activar la via de la MAP-quinasa que porta a apoptosi en una línia cel·lular d'insulinoma de

rata (Rumora *et al.*, 2003).

3. L'ADIPÒCIT COM A FONT D'SSAO/VAP-1

A causa de l'augment de la forma soluble d'SSAO en la patologia diabètica (Boomsma *et al.*, 1995a; Garpenstrand *et al.*, 1999), de la importància del teixit adipós en aquesta malaltia (Abel *et al.*, 2001) i del fet que el teixit adipós expressa abundantment SSAO (Barrand and Callingham, 1984; Morris *et al.*, 1997; Raimondi *et al.*, 1991), ens vam plantejar la possibilitat que l'SSAO present a la circulació fos, en part, alliberada per la cèl·lula adiposa.

En aquest sentit, es van fer dos tipus d'experiments: per una banda, es van determinar les variacions d'SSAO en el plasma de rates diabètiques i de rates en què es feia una ablació parcial del teixit adipós; i d'altra banda, es va estudiar l'alliberament d'SSAO per adipòcits en cultiu i la regulació d'aquest alliberament.

L'estudi de l'activitat SSAO en el plasma de rates diabètiques per estreptozotocina i de rates Goto-Kakizaki va confirmar un augment d'aquesta activitat associada a l'estat diabètic (figura 7 A, article 4). Per la seva part, l'ablació del teixit adipós epididimal i perirenal de rates *Wistar* va provocar una disminució de l'activitat SSAO en el plasma dels animals (figura 7 B, article 4). Aquests resultats suggereixen la contribució del teixit adipós, òrgan de gran importància en la patologia diabètica i en situació d'obesitat, en els nivells d'activitat a la circulació, ja que tant un estat que porta associada l'alteració metabòlica del teixit adipós com la reducció d'aquest alteren l'activitat SSAO en el plasma.

La correlació observada entre la quantitat d'SSAO present al medi de cultiu i l'activitat amino-oxidasa en aquest medi (figura 39 dels resultats) ens indica que tota l'activitat amino-oxidasa del medi és SSAO. Aquest resultat està en concordança amb estudis on es demostra que: *a*) la VAP-1 del sèrum és la única responsable de l'activitat SSAO ja que la eliminació de VAP-1 mitjançant cromatografia d'immunoafinitat elimina tota l'activitat SSAO (Kurkijarvi *et al.*, 2000), *b*) en diabetis, hi ha una correlació entre l'augment de l'activitat SSAO a la circulació i la quantitat de proteïna SSAO (Salmi *et al.*, 2002).

Una demostració més directa de l'alliberament d'SSAO pel teixit adipós es va obtenir en detectar-se tant la proteïna com l'activitat SSAO en medis de cultiu d'adipòcits 3T3-L1 i explants de teixit adipós humà (figura 1 i 2, article 4 i figura 33 dels resultats). A més a més, es va demostrar que aquest alliberament estava regulat per metal·loproteases de matriu (MMP), ja que la inhibició d'aquestes per batimastat provocava una disminució de la quantitat i de l'activitat SSAO present als medis de cultiu (figura 3, article 4). En relació amb la metal·lo-proteasa de matriu implicada, aquestes pertanyen a una família de 24 endopeptidases neutres capaces de trencar tots els components de la matriu extracel·lular, així com també altres

proteïnes, entre les quals es troben les proteïnes d'adhesió. Totes les MMP, excepte l'MMP-8, han estat identificades al teixit adipós de ratolí (Maquoi *et al.*, 2002); en adipòcits amb dues setmanes de diferenciació, les MMP-2, -3, -7, -9, -10, -11, -12, -13, -16 i -24 són les que presenten nivells d'expressió més elevats (Maquoi *et al.*, 2002). Les MMP han estat implicades en el metabolisme i la diferenciació del teixit adipós; així doncs, les MMP-2, -3, -12, -14 i -19 estan sobreexpressades en un model d'obesitat induïda per la dieta (Chavey *et al.*, 2003), la inhibició de l'MMP-2 i l'MMP-9 disminueix la diferenciació adipocitària (Bouloumie *et al.*, 2001) i el *knock out* d'MMP-3 causa hipertròfia en el desenvolupament del teixit adipós (Maquoi *et al.*, 2003). La regulació de l'SSAO per les MMP és un altre indici, com ja s'havia indicat amb l'estimulació de la diferenciació adipocitària per substrats de l'SSAO (Fontana *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2001), que suggereix un paper de l'SSAO en el metabolisme del teixit adipós.

D'altra banda, la inhibició de l'SSAO en adipòcits 3T3-L1 en cultiu per l'addició de semicarbazida va provocar un augment de l'alliberament de l'SSAO (figura 6, article 4); aquest fet suggereix la necessitat d'una activitat SSAO a la membrana o al medi perquè els nivells alliberats es mantinguin. Així doncs, ja que un dels productes que l'SSAO catalitza és el H_2O_2 i que aquest pot regular les MMP (Yoon *et al.*, 2002), el mecanisme de control de l'alliberament de l'SSAO sembla que està regulat per la pròpia activitat via la regulació de les proteïnes responsables de la seva proteòlisi, de manera que una manca en la producció de H_2O_2 provocaria una alteració en la pauta normal d'alliberament d'SSAO. Són necessaris més estudis per confirmar la importància del H_2O_2 en l'alliberament de l'SSAO.

El factor de necrosi tumoral alfa (TNFα), implicat en fenòmens de resistència a la insulina, i el missatger intracel·lular adenosina monofosfat cíclic (AMPc), factor clau en el metabolisme de l'adipòcit (Hotamisligil *et al.*, 1993; Piper *et al.*, 1993), provoquen un augment en l'alliberament d'SSAO (Figures 4 i 5, article 4). Aquest resultat suggereix que l'augment de l'SSAO circulant observat en la diabetis pot ser degut a un augment de l'alliberament de l'enzim pel teixit adipós regulat per aquests factors. En aquest sentit, s'han descrit augments de TNFα en estats de resistència a la insulina (Hotamisligil *et al.*, 1995) de manera que augmentaria l'alliberament d'SSAO pel teixit adipós, cosa que explica l'augment observat en la diabetis; així mateix, s'ha descrit també l'alliberament d'altres proteïnes d'adhesió, en diferents models cel·lulars, pel TNFα (Leung, 1999). Pel que fa a l'AMPc, la seva producció per l'adenilat-ciclasa després d'un estímul β-adrenèrgic provoca un efecte lipolític a les cèl·lules adiposes; la insulina exerceix efectes antilipolítics via l'activació de la PDE (fosfodiesterasa) que hidrolitza l'AMPc a AMP (Bolinder *et al.*, 1996; Chatzipanteli and Saggerson, 1983). En la diabetis *mellitus* de tipus 1, on no hi ha insulina, es produeix un augment d'AMPc, ja que aquest no és hidrolitzat; l'augment d'AMPc augmentarà l'alliberament d'SSAO pel teixit adipós, la qual cosa pot contribuir a l'augment de la forma soluble observada en aquest tipus de diabetis. Aquest és el cas de les rates diabètiques per estreptozotocina que, a més a més, a causa dels efectes lipolítics de l'AMPc, perden part del teixit adipós amb l'establiment de la diabetis. Tot i la pèrdua

parcial de teixit adipós que aquests animals pateixen, l'SSAO circulant augmenta, segurament perquè el teixit que queda allibera més SSAO per l'acció de l'AMPc. A la figura 3 s'esquematitza l'alliberament d'SSAO per la cèl·lula adiposa.

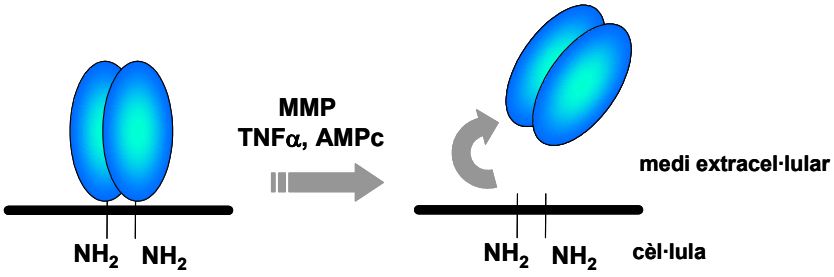


Figura 3. Mecanisme d'alliberament de SSAO per la cèl·lula adiposa

Mentre que en condicions control la proteïna present al medi de cultiu després de dos dies d'incubació representa el 0,63% de la quantitat que es troba a la membrana plasmàtica (l'activitat al medi era de 278 ± 13 pmol/h/placa, i la present als homogenats dels adipòcits, 290 ± 40 pmol/min/mg de proteïna), en el cas de les cèl·lules que havien estat incubades amb TNFα aquesta és d'1,76% (455 ± 103 pmol/h/placa i 172 ± 55 pmol/min/mg de proteïna, activitat al medi i als homogenats, respectivament) i d'1,51% en el cas del tractament amb AMPc (647 ± 100 pmol/h/placa i 285 ± 52 pmol/min/mg de proteïna, activitat al medi i als homogenats, respectivament). Sabent que als adipòcits de rata la quantificació del nombre de molècules d'SSAO indica que hi ha 14 x 10^6 còpies per cèl·lula (Morris *et al.*, 1997) i que a cada placa de cultiu creixen unes 4 x 10^6 cèl·lules, resulta que, en condicions normals, trobarem 5 x 10^{11} còpies d'SSAO al medi de cultiu de dos dies i en el cas dels adipòcits tractats amb TNFα o AMPc la quantitat d'SSAO present als medis de cultiu serà de 9,9 x 10^{11} i 8,5 x 10^{11}, respectivament. Així doncs, encara que la proporció d'SSAO alliberada respecte a la present a la membrana de la cèl·lula no sembla gaire elevada, a causa del fet que els adipòcits expressen molta SSAO, la quantitat que aquestes cèl·lules són capaces d'alliberar és notable, i és d'aproximadament el doble en presència de TNFα i AMPc que en condicions normals. És interessant remarcar que, amb la diabetis, la quantitat d'SSAO circulant en el plasma és, també, d'aproximadament el doble que en condicions normals (figura 7, article 4).

Els resultats obtinguts en aquesta tesi, i que es descriuen a l'article 4, suggereixen que la forma soluble de l'SSAO es produeix a partir del tall proteolític o *shedding* de la forma de membrana. Els resultats que ens han portat a la conclusió que el mecanisme és el del tall proteolític són els següents:

1. La reducció de pes molecular de 2 kDa està d'acord amb la pèrdua del domini transmembrana i citoplasmàtic de la proteïna (figura 2 B, article 4) (Smith *et al.*, 1998).
2. Els valors de Km per a l'oxidació de benzilamina de l'activitat enzimàtica preparada de medi o membrana (43 ± 8 μM i 25 ± 5 μM, respectivament) són molt semblants (figura 1

B, article 4)

3. La proteïna soluble i la de membrana presenten la mateixa quantitat de glucosilacions i de residus d'àcid siàlic (figura 2 B, article 4).
4. L'inhibidor de metal·loproteases batimastat redueix entre un 80 i un 95% l'activitat SSAO al medi i la quantitat de proteïna alliberada pels adipòcits 3T3-L1 i pels adipòcits humans (figura 3, article 4).
5. A més a més, un altre membre de la família de les amino-oxidases amb cofactor sensible a grups carbonil, la lisiloxidasa (vegeu la introducció), se sintetitza com a precursor i és alliberat a l'espai extracel·lular, on fa la seva funció, després ser tallat per la metal·lo-proteasa PCB/BMP-1 (Panchenko *et al.*, 1996).

A la bibliografia existeixen evidències que donen suport a la idea que la proteïna soluble prové del mateix gen que la de membrana i que possiblement s'allibera per un procés de *shedding* més que per un de *splicing* alternatiu. Altres autors postulen l'existència de dos gens diferents. Aquests estudis s'han dut a terme en espècies diferents a la humana, de manera que sembla que en el cas humà la hipòtesi d'un mateix gen és la més acceptada. A continuació es resumeixen breument les evidències descrites a la bibliografia en els dos sentits.

Evidències de l'existència d'un sol gen per a la proteïna de membrana i la soluble:

1. Els estudis cinètics de Lizcano i col·laboradors indiquen que les formes de membrana i soluble bovines presenten les mateixes característiques cinètiques (Lizcano and Unzeta, 2000).
2. En humans, la proteïna soluble pot ser produïda a partir de la forma expressada en cèl·lules endotelials hepàtiques (Kurkijarvi *et al.*, 2000).
3. En humans, els gens descrits que codifiquen per SSAO (AOC2 i 3; vegeu el punt 2.1.1. de la introducció) formen un clúster al braç llarg del cromosoma 17 i són els únics que s'identifiquen a la seqüència publicada del genoma humà (Jalkanen and Salmi, 2001). En el cas de ratolí, la cerca de gens homòlegs a mVAP-1 al genoma publicat només permet identificar la proteïna ja clonada mDAO i una proteïna que seria homòloga a la hRAO.

Evidències de l'existència de dos gens diferents per a la proteïna de membrana i la soluble:

1. Estudis cinètics indiquen que la forma de membrana i la soluble presenten diferents constants cinètiques en ovella (Boomsma *et al.*, 2000; Elliott *et al.*, 1992).
2. La seqüència de la proteïna circulant bovina presenta una homologia molt baixa a l'extrem N-terminal amb les proteïnes de membrana de diferents espècies. Així, entre l'arginina 16 de la forma soluble bovina, descrita com el primer aminoàcid de la forma

circulant madura, i una cisteïna que es troba dins del domini transmembrana en el cas de les formes de membrana, cisteïna 41 de la forma de membrana humana o de ratolí i cisteïna 40 de la forma soluble bovina (Mu *et al.*, 1994) (vegeu l'alineament de la figura 13 de la introducció), no s'observen homologies de seqüència entre la forma soluble bovina i les diferents formes clonades de membrana mentre que a partir d'aquesta cisteïna l'homologia augmenta considerablement.

3. L'any 1998 Hogdall i col·laboradors descriuen que el cDNA parcial de la proteïna bovina de membrana presenta un 94% d'homologia amb la BSAO (Hogdall *et al.*, 1998). Analitzen també una llibreria genòmica bovina i troben tres gens: el primer, que s'expressa al pulmó, al fetge, al cor i a la melsa, codificaria per la forma de membrana. El segon, que s'expressa al fetge codificaria per la forma soluble. El darrer codifica per la bDAO. Tot i aquesta descripció, la seqüència descrita per l'extrem N-terminal no està completament acceptada; així, Lizcano i col·laboradors troben diferències en el 50% dels aminoàcids de la regió N-terminal amb aquests autors (Lizcano and Unzeta, 2000).
4. Hi ha una seqüència enviada a NCBI (AB019242) (Iwabuki *et al.*, 1998) que descriu un gen per a la forma bovina de membrana, el qual presenta una elevada homologia a l'extrem N-terminal amb la resta de formes de membrana publicades i que discrepa amb la seqüència descrita per Hogdall, on descrivien una seqüència per a l'extrem N-terminal molt semblant a la de la forma soluble.
5. En porcs, la purificació de la forma de membrana de l'aorta i de la forma plasmàtica va mostrar una diferència en la seqüència del centre actiu. Així, després de la seqüència consensus (Asn-Tyr-Asp-Tyr), l'SSAO plasmàtica conté una valina mentre que la forma de membrana conté una tirosina (Holt *et al.*, 1998).

Pel que fa a la funció fisiològica de la forma soluble, s'ha implicat en l'activació dels limfòcits de la circulació augmentant la seva unió a les cèl·lules endotelials (Kurkijarvi *et al.*, 1998). Un augment en la forma soluble de l'SSAO a la circulació, com el que s'ha observat en diverses patologies, podria causar: *a*) acumulació dels limfòcits als vasos sanguinis, *b*) disfuncions a l'endoteli via els potencials productes citotòxics generats per l'activitat amino-oxidasa de l'enzim: l'aldehid, l'amoni i el peròxid d'hidrogen (Callingham *et al.*, 1990). Aquests processos s'han postulat relacionats en lesions aterogèniques (Meszaros *et al.*, 1999; Yu and Deng, 1998) i en el desenvolupament de l'angiopatia i la retinopatia associada a la diabetis (Yu and Zuo, 1993; Yu and Zuo, 1997). El teixit adipós, com a font de formes solubles de molècules d'adhesió, podria contribuir a les complicacions cardiovasculars associades a la diabetis. D'altra banda, altres evidències mostren que, malgrat els putatius efectes tòxics de l'SSAO, aquesta també és necessària per al funcionament i desenvolupament correctes del sistema vascular (Langford *et al.*, 1999; Langford *et al.*, 2002). Així mateix, la seva inhibició ha estat relacionada amb diferents patologies (Lewinsohn, 1977; Lizcano *et al.*, 1991) (vegeu el punt 2.3. de la introducció). Fan falta, doncs, estudis més concloents que estableixin el paper funcional de l'SSAO/VAP-1 circulant a la sang.

En aquest treball hem descrit l'alliberament d'una proteïna d'adhesió, SSAO/VAP-1, pel teixit adipós, la qual l'implica en les complicacions cròniques associades a la diabetis. Estudis futurs amb ratolins *knock out* per a l'SSAO permetran corroborar aquests resultats. Altres estudis programats inclouen: *a*) l'anàlisi de la secreció d'altres proteïnes d'adhesió que també es troben augmentades en diabetis per part de l'adipòcit; en aquest sentit i en el cas de l'obesitat, s'ha descrit que la pèrdua de pes es correlaciona amb una reducció del nivell de les formes solubles de proteïnes d'adhesió (Ferri *et al.*, 1999); *b*) el possible alliberament d'SSAO per altres models cel·lulars diferents a la cèl·lula adiposa i que també expressen abundosament la proteïna, com podrien ser les cèl·lules musculars llises, també implicades en les complicacions cardiovasculars; *c*) la funció d'aquesta SSAO soluble sobre les pròpies cèl·lules adiposes i sobre altres tipus cel·lulars com, per exemple, les cèl·lules de la musculatura llisa o les cèl·lules endotelials dels vasos. Aquests darrers estudis permetran comprovar o descartar la toxicitat d'un augment de l'SSAO sobre el sistema vascular, relacionada, fins al moment de manera indirecta, amb els problemes aterogènics i de toxicitat vascular associats a la diabetis *mellitus*.

4. VISIÓ GLOBAL DE L'ADMINISTRACIÓ DE SUBSTRATS DE L'SSAO

Actualment es desconeix la funció fisiològica de la forma de membrana de l'SSAO als adipòcits; en cèl·lules endotelials, la seva funció d'adhesió està implicada en l'adhesió dels limfòcits, sense estar totalment establerta la participació de l'activitat enzimàtica en aquest procés. Pel que fa a la forma soluble, com acabem de veure, calen més estudis per establir clarament la seva funció i la seva toxicitat potencial. Així doncs, com en el cas de moltes altres proteïnes, no estem davant una proteïna que es pugui considerar perjudicial o beneficiosa per a l'organisme, sinó que es tracta del manteniment d'un balanç, de manera que tant augments com reduccions poden desencadenar problemes per al metabolisme.

En aquest sentit, l'administració d'un substrat pel tractament de la diabetis es pot interpretar com una alteració d'aquest balanç; malgrat això, com ja he comentat, hi ha indicis que ens suggereixen que l'administració de determinades amines no ha de ser negativa. D'una banda, els danys vasculars descrits s'han relacionat amb la producció de formaldehid i l'excessiva adhesió de limfòcits a la paret vascular; d'altra banda, tot i que no s'ha descobert el lligand o substrat endogen de l'SSAO/VAP-1, sembla que una amina de la superfície dels limfòcits seria el lligand per a l'adhesió i que amines tòxiques produïdes pel metabolisme, com ara la metilamina i l'aminoacetona entre d'altres, o ingerides amb la dieta serien els substrats endògens. Així, l'administració d'un substrat exogen competiria amb aquest substrat o lligand endogen i actuaria com un inhibidor competitiu i, per tant, disminuiria els processos tòxics d'excessiva adhesió o producció de formaldehid. A més a més, aquest fet pot ser de gran importància en la patologia diabètica, on hi ha augments de l'activitat SSAO en la circulació;

l'administració d'un substrat de l'SSAO podria, d'una banda, competir amb els endògens i per tant evitar els efectes tòxics i, d'altra banda, produir compostos insulinomimètics o insulinosensibilitzadors que ajudin a la millora de l'estat diabètic.

Pel que fa a la funció de l'SSAO al teixit adipós, en aquesta tesi s'ha treballat poc aquest aspecte de la proteïna. Malgrat això, l'observació que el teixit adipós de les rates diabètiques per estreptozotocina es recupera després del tractament crònic amb benzilamina i vanadat, com ja he comentat, ens indica un possible paper de l'SSAO en el desenvolupament d'aquest teixit. En aquest sentit, el fet que l'SSAO/VAP-1 presenti propietats d'adhesió en cèl·lules endotelials afavoreix aquesta idea ja que mitjançant contactes cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular, pot transcriure senyals que indicaran a l'adipòcit si pot continuar creixent. Així mateix, els estudis de la implicació de l'SSAO i els seus substrats en el procés adipogènic afavoreixen aquesta idea i suggereixen una interrelació de la funció d'adhesió i l'activitat enzimàtica en aquest model cel·lular, com sembla donar-se a les cèl·lules endotelials.

VI. CONCLUSIONS

1. Els substrats de l'SSAO en combinació amb vanadat estimulen el transport de glucosa als adipòcits en condicions en les quals es produeix peroxovanadat, s'inhibeix l'activitat proteïna tirosina-fosfatasa i s'activa l'IRS-1, l'IRS-3, la PI3K i la proteïna-quinasa B.

2. L'administració aguda de benzilamina i vanadat augmenta la tolerància a la glucosa de rates no diabètiques, de rates diabètiques per estreptozotocina i de rates diabètiques Goto-Kakizaki; així mateix, estimula el transport de glucosa al múscul per un mecanisme que requereix, almenys *in vitro*, l'activitat SSAO.

3. L'administració crònica de benzilamina i vanadat normalitza la glucèmia en rates diabètiques per estreptozotocina i en rates Goto-Kakizaki.

4. En rates diabètiques per estreptozotocina, l'administració crònica de benzilamina i vanadat augmenta el transport de glucosa basal i el transport estimulat per insulina, així com la quantitat total de GLUT4, als adipòcits. En rates Goto-Kakizaki, aquesta administració crònica augmenta el transport de glucosa i la quantitat de GLUT4 present a la membrana plasmàtica en cèl·lules adiposes no estimulades, i també el transport estimulat per insulina al múscul *soleus*.

5. En rates Goto-Kakizaki, la combinació de benzilamina i vanadat estimula la secreció d'insulina en illots pancreàtics i la seva administració aguda provoca la recuperació de la primera fase de la secreció de la insulina.

6. El peroxovanadat produït per l'activitat SSAO en presència de vanadat inhibeix activitats proteïna tirosina-fosfatasa. La generació local de peroxovanadat basada en l'activitat SSAO pot representar una nova estratègia terapèutica pel tractament de la diabetis *mellitus*.

7. Els adipòcits 3T3-L1 i els explants humans de teixit adipós alliberen SSAO soluble al medi de cultiu, en un procés dependent de metal·loproteases de matriu i regulat per factors implicats en la resistència a la insulina com són el TNFα i l'AMP cíclic. L'augment de l'alliberament de la SSAO pel teixit adipós podria participar en l'augment de la forma soluble observada en diabetis.

VII. ABREVIATURES

2DG: 2-deoxiglucosa.

Acrp30: Adiponectina.

ACS: acetil-CoA sintasa.

AdipoQ: Adiponectina.

ADP: Adenosina difosfat.

AGE: Productes finals d'avançada glicació.

Akt: Proteïna-quinasa B.

AMP: Adenosina monofosfat.

AMPc: AMP cíclic.

AO: Amino-oxidasa.

AOC: Gens que codifiquen per amino-oxidases humanes.

ap2: Proteïna adipocitària lligand d'àcids grassos lliures.

APS: Substrats associat a la proteïna, en la via de la insulina independent del a PI3K.

APS: Persulfat amònic.

ATP: Adenosina trifosfat.

b: boví.

BCA: Àcid bicinconínic. Mètode per a la determinació de la concentració de proteïnes.

Benz: Benzilamina.

BMI: Índex de massa corporal.

bp: Parells de bases, en la seqüència de DNA.

BSA: Albúmina de sèrum boví.

BSAO: Amino-oxidasa de sèrum boví.

CAP: Proteïna associada a Cbl.

cDNA: DNA complementari a una seqüència d'RNA sintetitzada a partir d'una reacció de retrotranscripció.

CS: Sèrum de vedella.

CTP: Citidina trifosfat.

cytPTK: Proteïna tirosina-quinasa de citosol.

DAO: Diamino-oxidasa.

db-AMPc: dibutiril-AMPc.

DEPC: Dietil pirocarbonat, utilitzat per a preparar solucions lliures d'RNAses.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, medi de cultiu.

DMSO: Dimetilsulfòxid. Solvent orgànic de múltiples utilitats, entre elles, com a crioprotector.

DNA: Àcid desoxirribonuclèic.

dNTP: Abreviatura que designa qualsevol desoxirribonucleòtid trifosfat o la barreja de dATP, dCTP, dGTP i dTTP a parts iguals.

dpm: Desintegracions per minut.

DTT: Ditiotreitol. Agent reductor i antioxidant, capaç de trencar ponts disulfur.

DTZ: Ditizona. Colorant per a la tinció d'illots pancreàtics.

ECL: *Enhanced Chemioluminiscence*. Reactiu per al revelat de *Western blot*.

EDL: Múscul *Extensor Digitorum Longus.*

EDTA: Etilè diamino tetra-acetat. Agent quelant de cations de doble càrrega.

EGTA: Agent quelant de cations semblant al EDTA.

ES: Error estàndard.

***et al.*:** Llatinisme abreviat que significa "i col·laboradors".

F: Flotillina.

FAD: Dinucleòtid de flavina i adenina.

FATP: Proteïna transportadora d'àcids grassos.

FBS: Sèrum fetal boví.

FFA: Àcids grassos lliures.

G6P: Glucosa-6-fosfat.

GK: Rates Goto-Kakizaki.

GLUT1: Transportador de glucosa basal.

GLUT4: Transportador de glucosa sensible a la insulina.

GSK-3: Glicogen sintasa quinasa 3.

GTC: Isocianat de guanidina.

GTP: Guanosina trifosfat.

h: humà.

HEPES: Reactiu tamponador de pH.

HES: Tampó que conté hepes, EDTA i sacarosa.

HK: Hexoquinasa.

HLS: lipasa sensible a hormones.

hpAO: Amino-oxidasa de placenta humana.

hRAO: Amino-oxidasa de retina humana.

IAPP: *Isled amyloid polypeptide.*

IBMX: Metilisobutilxantina.

ICAM-1: Molècula d'adhesió intracel·lular-1.

IDDM: Diabetis insulinodependent.

IGT: Intolerància a la glucosa.

IL6: Interleuquina 6.

IR: Receptor de la insulina.

IRS: Substrat del receptor de la insulina.

Km: Constant de Michaelis ($K_{0,5}$).

KRHB: Tampó *Krebs-Ringer Hepes.*

KRHBA: Tampó *Krebs-Ringer Hepes* amb albúmina.

LAR: Proteïna-fosfatasa relacionada a l'antigen de leucòcits.

LDM: Microsomes lleugers.

LPL: Lipoproteïna-lipasa.

LO: Lisiloxidasa.

LSB: Tampó de mostra de Laemmli.

LTQ: Lisil-tirosil quinona, cofactor de la lisiloxidasa.

m: ratolí.

MAO: Mono amino-oxidasa.

MAPK: Proteïna-quinasa activada per mitogens.

membPTK: Proteïna tirosina-quinasa de membrana.

MMP: Metal·lo-proteasa de matriu.

MODY: *Maturity-Onset Diabetis of the Youth*. Tipus de diabetis.

mRNA: Àcid ribonuclèic missatger.

mTOR: Proteïna de mamífers diana de la rapamicina.

NADH: Dinucleòtid de nicotinamida i adenina.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*. Organisme públic del govern dels Estats Units per centralitzar tota la informació de seqüències biològiques.

NEFA: Àcids grassos no esterificats.

NIDDM: Diabetis no insulinodependent.

p110: Domini catalític de la PI3K.

p85: Domini regulador de la PI3K.

PAGE: Elelctroforesi en gel de poliacrilamida.

PAO: Poliamino-oxidasa.

PBS: Tampó fosfat salí.

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa.

PDE: Fosfodiesterasa.

PDGF: Factor de creixement derivat de plaquetes.

PDH: Piruvat deshidrogenasa.

PDK-1: Proteïna-quinasa dependent de 3-fosfoinositol.

PFA: Paraformaldehid.

PFK: Fosfofructoquinasa.

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa.

PI3P: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat.

PKB: Proteïna-quinasa B.

PKC ξ/λ: Isoformes de la proteïna-quinasa C atípiques.

PM: Membrana plasmàtica.

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoroanhidre.

pNP: p-nitrofenil.

pNPP: p-nitrofenil fosfat.

PQQ: Pirroloquinolina quinona.

PTB: Domini d'unió a fosfotirosines.

PTP: Proteïna tirosina-fosfatasa.

PTP-1B: Proteïna tirosina-fosfatasa-1B.

r: rata.

RGD: Motiu d'adhesió de les proteïnes d'adhesió.

RIA: Metodologia per a determinar les concentracions d'insulina.

RMN: Ressonància magnètica nuclear.

RNA: Àcid ribonuclèic.

RT: Retrotranscripció. Reacció que permet la síntesi de cDNA a partir de fragments d'RNA.

SCZ: Semicarbazida.

SDS: Dodecil sulfat sòdic.

SH2: Domini d'homologia a Scr2.

SH3: Domini d'homologia a Scr3.

SoHo: Domini d'homologia a sorbina.

SSAO: Amino-oxidasa sensible a semicarbazida.

sSSAO: Forma soluble de l'SSAO.

STZ: Estreptozotocina.

TAB: Teixit adipós blanc.

TAE: Tampó que conté trizma base, àcid acètic i EDTA per a mostres de DNA.

TBS: Tampó tris salí.

TC10: Proteïna G petita de la via d'estimulació de la insulina independent de la PI3K.

TDLB: Solució de lisi de triple detergent.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilèdiamina. Agent catalitzador de la polimerització dels gels d'acrilamida.

Tir: Tiramina.

TNFα: Factor de necrosi tumoral alfa.

TPQ: Topaquinona, cofactor de l'SSAO.

TPK: Tampó fosfat potàssic.

TRIS: Reactiu tamponador de pH.

TTG: Test de tolerància a la glucosa.

TTP: Timidina trifosfat.

TZD: Tiazolidinadiones.

UTP: Uracil trifosfat.

UTR: Regió transcrita no traduïda.

V: Vanadat.

VAP-1: Proteïna d'adhesió vascular-1.

VCAM-1: Molècula d'adhesió de les cèl·lules vasculars 1.

Vmax: Velocitat màxima.

VIII. REFERÈNCIES

Abdel-Halim, S.M., Guenifi, A., Khan, A., Larsson, O., Berggren, P.O., Ostenson, C.G. and Efendic, S. (1996) Impaired coupling of glucose signal to the exocytotic machinery in diabetic GK rats: a defect ameliorated by cAMP. *Diabetes*, **45**, 934-940.

Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I. and Kahn, B.B. (2001) Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, **409**, 729-733.

Ahima, R.S. and Flier, J.S. (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*, **11**, 327-332.

Ahmad, F., Azevedo, J.L., Cortright, R., Dohm, G.L. and Goldstein, B.J. (1997) Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest*, **100**, 449-458.

Ahmad, F., Considine, R.V. and Goldstein, B.J. (1995) Increased abundance of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR accounts for the elevated insulin receptor dephosphorylating activity in adipose tissue of obese human subjects. *J Clin Invest*, **95**, 2806-2812.

Ahmad, F. and Goldstein, B.J. (1995a) Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes. *Am J Physiol*, **268**, E932-940.

Ahmad, F. and Goldstein, B.J. (1995b) Increased abundance of specific skeletal muscle protein-tyrosine phosphatases in a genetic model of insulin-resistant obesity and diabetes *mellitus*. *Metabolism*, **44**, 1175-1184.

Ahmed, Z., Smith, B.J. and Pillay, T.S. (2000) The APS adapter protein couples the insulin receptor to the phosphorylation of c-Cbl and facilitates ligand-stimulated ubiquitination of the insulin receptor. *FEBS Lett*, **475**, 31-34.

Aledo, J.C., Lavoie, L., Volchuk, A., Keller, S.R., Klip, A. and Hundal, H.S. (1997) Identification and characterization of two distinct intracellular GLUT4 pools in rat skeletal muscle: evidence for an endosomal and an insulin-sensitive GLUT4 compartment. *Biochem J*, **325 (Pt 3)**, 727-732.

Alessi, D.R. and Cohen, P. (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 55-62.

Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A. and Bownes, M. (1997) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr Biol*, **7**, 776-789.

Alessi, D.R. and Downes, C.P. (1998) The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 151-164.

Alessi, D.R., Kozlowski, M.T., Weng, Q.P., Morrice, N. and Avruch, J. (1998) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase *in vivo* and *in vitro*. *Curr Biol*, **8**, 69-81.

Andres, N., Lizcano, J.M., Rodriguez, M.J., Romera, M., Unzeta, M. and Mahy, N. (2001) Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide- sensitive amine oxidase. *J Histochem Cytochem*, **49**, 209-217.

AnnotationProject. (2002) *NCBI, Direct Submission*.

Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 79-83.

Bandyopadhyay, G., Sajan, M.P., Kanoh, Y., Standaert, M.L., Quon, M.J., Lea-Currie, R., Sen, A. and Farese, R.V. (2002) PKC-zeta mediates insulin effects on glucose transport in cultured preadipocyte-derived human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 716-723.

Bandyopadhyay, G., Sajan, M.P., Kanoh, Y., Standaert, M.L., Quon, M.J., Reed, B.C., Dikic, I. and Farese, R.V. (2001) Glucose activates protein kinase C-zeta /lambda through proline-rich tyrosine kinase-2, extracellular signal-regulated kinase, and phospholipase D: a novel mechanism for activating glucose transporter translocation. *J Biol Chem*, **276**, 35537-35545.

Bandyopadhyay, G., Standaert, M.L., Sajan, M.P., Karnitz, L.M., Cong, L., Quon, M.J. and Farese, R.V. (1999) Dependence of insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and its target threonine-410 in the activation loop of protein kinase C-zeta. *Mol Endocrinol*, **13**, 1766-1772.

Banerji, M.A., Chaiken, R.L., Gordon, D., Kral, J.G. and Lebovitz, H.E. (1995) Does intra-abdominal adipose tissue in black men determine whether NIDDM is insulin-resistant or insulin-sensitive? *Diabetes*, **44**, 141-146.

Barrand, M.A. and Callingham, B.A. (1982) Monoamine oxidase activities in brown adipose tissue of the rat: some properties and subcellular distribution. *Biochem Pharmacol*, **31**, 2177-2184.

Barrand, M.A. and Callingham, B.A. (1984) Solubilization and some properties of a semicarbazide-sensitive amine oxidase in brown adipose tissue of the rat. *Biochem J*, **222**, 467-475.

Bartholeyns, J. and Bouclier, M. (1984) Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Res*, **44**, 639-645.

Bastard, J.P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., Vidal, H. and Hainque, B. (2000) Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 3338-3342.

Baumann, C.A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P.E., Pessin, J.E. and Saltiel, A.R. (2000) CAP defines a second signalling pathway required

for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*, **407**, 202-207.

Begum, N. and Ragolia, L. (1998) Altered regulation of insulin signaling components in adipocytes of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Metabolism*, **47**, 54-62.

Begum, N., Sussman, K.E. and Draznin, B. (1991) Differential effects of diabetes on adipocyte and liver phosphotyrosine and phosphoserine phosphatase activities. *Diabetes*, **40**, 1620-1629.

Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M. and Scherer, P.E. (2001) The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, **7**, 947-953.

Bergeret, B., Blaschko, H. and Hawes, R. (1957) Ocurrence o fan amine oxidase in horse serum. *Nature*, **180**, 1127-1128.

Berti, L., Kellerer, M., Capp, E. and Haring, H.U. (1997) Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect. *Diabetologia*, **40**, 606-609.

Beutler, B. and Cerami, A. (1988) Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocr Rev*, **9**, 57-66.

Bickel, P.E., Scherer, P.E., Schnitzer, J.E., Oh, P., Lisanti, M.P. and Lodish, H.F. (1997) Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem*, **272**, 13793-13802.

Biebl, M., Klocker, J., Perkmann, R., Kolbitsch, C., Klingler, P., Drasche, A., Klingler, A., Fraedrich, G. and Schwelberger, H.G. (2002) Heparin-induced diamine oxidase release into the circulation in pigs. *Inflamm Res*, **51 Suppl 1**, S93-94.

Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., van Rossum, G.D. and Turco, S. (1996) Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes *mellitus*. *Metabolism*, **45**, 1130-1135.

Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J.V. and Rossetti, L. (1994) Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*, **93**, 2438-2446.

Bolinder, J., Sjoberg, S. and Arner, P. (1996) Stimulation of adipose tissue lipolysis following insulin-induced hypoglycaemia: evidence of increased beta-adrenoceptor-mediated lipolytic response in IDDM. *Diabetologia*, **39**, 845-853.

Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R. and Wymann, M.P. (1998) Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science*, **282**, 293-296.

Bono, P., Jalkanen, S. and Salmi, M. (1999) Mouse vascular adhesion protein 1 is a sialoglycoprotein with enzymatic activity and is induced in diabetic insulitis. *Am J Pathol*, **155**, 1613-1624.

Bono, P., Salmi, M., Smith, D.J. and Jalkanen, S. (1998a) Cloning and characterization of mouse vascular adhesion protein-1 reveals a novel molecule with enzymatic activity. *J Immunol*, **160**, 5563-5571.

Bono, P., Salmi, M., Smith, D.J., Leppanen, I., Horelli-Kuitunen, N., Palotie, A. and Jalkanen, S.

(1998b) Isolation, structural characterization, and chromosomal mapping of the mouse vascular adhesion protein-1 gene and promoter. *J Immunol*, **161**, 2953-2960.

Boomsma, F., Derkx, F.H., van den Meiracker, A.H., Man in 't Veld, A.J. and Schalekamp, M.A. (1995a) Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase activity is elevated in diabetes *mellitus* and correlates with glycosylated haemoglobin. *Clin Sci (Lond)*, **88**, 675-679.

Boomsma, F., van den Meiracker, A., Man in 't Veld, A. and Schalekamp, M. (1995b) Contrasting effects of peripheral decarboxylase inhibitors on plasma activity of aromatic-L-amino acid decarboxylase and semicarbazide- sensitive amine oxidase in Parkinson's disease. *Life Sci*, **57**, 1753-1759.

Boomsma, F., van Dijk, J., Bhaggoe, U.M., Bouhuizen, A.M. and van den Meiracker, A.H. (2000) Variation in semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in plasma and tissues of mammals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **126**, 69-78.

Boomsma, F., van Veldhuisen, D.J., de Kam, P.J., Man in't Veld, A.J., Mosterd, A., Lie, K.I. and Schalekamp, M.A. (1997) Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc Res*, **33**, 387-391.

Borel, A., Eichenberger, D., Farjanel, J., Kessler, E., Gleyzal, C., Hulmes, D.J., Sommer, P. and Font, B. (2001) Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *J Biol Chem*, **276**, 48944-48949.

Bosch, F., Rodriguez-Gil, J.E., Hatzoglou, M., Gomez-Foix, A.M. and Hanson, R.W. (1992) Lithium inhibits hepatic gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *J Biol Chem*, **267**, 2888-2893.

Bouloumie, A., Sengenes, C., Portolan, G., Galitzky, J. and Lafontan, M. (2001) Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes*, **50**, 2080-2086.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

Braiman, L., Alt, A., Kuroki, T., Ohba, M., Bak, A., Tennenbaum, T. and Sampson, S.R. (2001) Activation of protein kinase C zeta induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell Biol*, **21**, 7852-7861.

Brichard, S.M. and Henquin, J.C. (1995) The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends Pharmacol Sci*, **16**, 265-270.

Brownlee, M. (1994) Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*, **43**, 836-841.

Bruinenberg, P.G., Evers, M., Waterham, H.R., Kuipers, J., Arnberg, A.C. and Ab, G. (1989) Cloning and sequencing of the peroxisomal amine oxidase gene from Hansenula polymorpha. *Biochim Biophys Acta*, **1008**, 157-167.

Bucala, R., Makita, Z., Koschinsky, T., Cerami, A. and Vlassara, H. (1993) Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6434-6438.

Burdon, R.H. (1996) Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans*, **24**, 1028-1032.

Burgering, B.M. and Coffer, P.J. (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, **376**, 599-602.

Butcher, E.C. and Picker, L.J. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, **272**, 60-66.

Callingham, B.A., Crosbie, A.E. and Rous, B.A. (1995) Some aspects of the pathophysiology of semicarbazide-sensitive amine oxidase enzymes. *Prog Brain Res*, **106**, 305-321.

Callingham, B.A., Holt, A. and Elliott, J. (1990) Some aspects of the pharmacology of semicarbazide-sensitive amine oxidases. *J Neural Transm Suppl*, **32**, 279-290.

Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R. and Burn, P. (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, **269**, 546-549.

Carlson, J.C. and Sawada, M. (1995) Generation of free radicals and messenger function. *Can J Appl Physiol*, **20**, 280-288.

Carpene, C., Fontana, E., Morin, N., Visentin, V., Prevot, D. and Castan, I. (2001) Substrates of semicarbazide-sensitive amine oxidase mimic diverse insulin effects in adipocytes. *Inflamm Res*, **50 Suppl 2**, S142-143.

Carpenter, C.L., Auger, K.R., Duckworth, B.C., Hou, W.M., Schaffhausen, B. and Cantley, L.C. (1993) A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol Cell Biol*, **13**, 1657-1665.

Cases, J.A., Gabriely, I., Ma, X.H., Yang, X.M., Michaeli, T., Fleischer, N., Rossetti, L. and Barzilai, N. (2001) Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion *in vivo*. *Diabetes*, **50**, 348-352.

Chatzipanteli, K. and Saggerson, D. (1983) Streptozotocin diabetes results in increased responsiveness of adipocyte lipolysis to glucagon. *FEBS Lett*, **155**, 135-138.

Chavey, C., Mari, B., Monthouel, M.N., Bonnafous, S., Anglard, P., Van Obberghen, E. and Tartare-Deckert, S. (2003) Matrix Metalloproteinases Are Differentially Expressed in Adipose Tissue during Obesity and Modulate Adipocyte Differentiation. *J Biol Chem*, **278**, 11888-11896.

Cheatham, B., Vlahos, C.J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J. and Kahn, C.R. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol*, **14**, 4902-4911.

Chen, H., Cong, L.N., Li, Y., Yao, Z.J., Wu, L., Zhang, Z.Y., Burke, T.R., Jr. and Quon, M.J. (1999) A phosphotyrosyl mimetic peptide reverses impairment of insulin-stimulated translocation of GLUT4 caused by overexpression of PTP-1B in rat adipose cells. *Biochemistry*, **38**, 384-389.

Chen, H., Wertheimer, S.J., Lin, C.H., Katz, S.L., Amrein, K.E., Burn, P. and Quon, M.J. (1997) Protein-tyrosine phosphatases PTP-1B and syp are modulators of insulin-stimulated

translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *J Biol Chem*, **272**, 8026-8031.

Chen, M.D., Yang, V.C., Alexander, P.S., Lin, P.Y. and Song, Y.M. (2001) Effects of selected minerals on leptin secretion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, **226**, 836-840.

Cheng, H.C., Abdel-Ghany, M., Elble, R.C. and Pauli, B.U. (1998) Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J Biol Chem*, **273**, 24207-24215.

Chiang, S.H., Baumann, C.A., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Watson, R.T., Neudauer, C.L., Macara, I.G., Pessin, J.E. and Saltiel, A.R. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, **410**, 944-948.

Cohen, B., Novick, D. and Rubinstein, M. (1996) Modulation of insulin activities by leptin. *Science*, **274**, 1185-1188.

Cohen, N., Halberstam, M., Shlimovich, P., Chang, C.J., Shamoon, H. and Rossetti, L. (1995) Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes *mellitus*. *J Clin Invest*, **95**, 2501-2509.

Conforti, L., Pirisino, R., Ignesti, G., Banchelli, G. and Raimondi, L. (1995) Semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in white adipose tissue of the insulin-deficient rat. *J Pharm Pharmacol*, **47**, 420-424.

Cong, L.N., Chen, H., Li, Y., Zhou, L., McGibbon, M.A., Taylor, S.I. and Quon, M.J. (1997) Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol Endocrinol*, **11**, 1881-1890.

Cooke, D.W. and Lane, M.D. (1999) Transcription factor NF1 mediates repression of the GLUT4 promoter by cyclic-AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, **260**, 600-604.

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

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-789.

Czech, M.P., Lawrence, J.C., Jr. and Lynn, W.S. (1974) Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 4173-4177.

Dadke, S.S., Li, H.C., Kusari, A.B., Begum, N. and Kusari, J. (2000) Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **274**, 583-589.

Davies, M.S., Henney, A., Ward, W.H. and Craig, R.K. (1986) Characterisation of an mRNA encoding a human ribosomal protein homologous to the yeast L44 ribosomal protein. *Gene*, **45**, 183-191.

DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., Sato, Y., Felig, P. and Wahren, J. (1981) Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J Clin Invest*, **68**, 1468-1474.

Deng, Y., Boomsma, F. and Yu, P.H. (1998) Deamination of methylamine and aminoacetone increases aldehydes and oxidative stress in rats. *Life Sci*, **63**, 2049-2058.

Deng, Y. and Yu, P.H. (1999) Simultaneous determination of formaldehyde and methylglyoxal in urine: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in diabetic complications. *J Chromatogr Sci*, **37**, 317-322.

Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M.J., Gout, I., Totty, N.F., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K. and *et al.* (1994) PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *Embo J*, **13**, 522-533.

Domingo, J.L., Gomez, M., Sanchez, D.J., Llobet, J.M. and Keen, C.L. (1995) Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. *Mol Cell Biochem*, **153**, 233-240.

Domingo, J.L., Sanchez, D.J., Gomez, M., Llobet, J.M. and Corbella, J. (1993) Oral vanadate and Tiron in treatment of diabetes *mellitus* in rats: improvement of glucose homeostasis and negative side-effects. *Vet Hum Toxicol*, **35**, 495-500.

Dooley, D.M., McGuirl, M.A., Brown, D.E., Turowski, P.N., McIntire, W.S. and Knowles, P.F. (1991) A Cu(I)-semiquinone state in substrate-reduced amine oxidases. *Nature*, **349**, 262-264.

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M.E., Dufour, S., Cline, G.W., Slezak, L.A., Andersen, D.K., Hundal, R.S., Rothman, D.L., Petersen, K.F. and Shulman, G.I. (1999) Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*, **103**, 253-259.

D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H. and Plow, E.F. (1991) Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci*, **16**, 246-250.

Dubyak, G.R. and Kleinzeller, A. (1980) The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. Dissociation from effects of vanadate as a (Na+-K+)ATPase inhibitor. *J Biol Chem*, **255**, 5306-5312.

Duckworth, W.C., Solomon, S.S., Liepnieks, J., Hamel, F.G., Hand, S. and Peavy, D.E. (1988) Insulin-like effects of vanadate in isolated rat adipocytes. *Endocrinology*, **122**, 2285-2289.

Edelstein, D. and Brownlee, M. (1992) Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes*, **41**, 26-29.

Egawa, K., Maegawa, H., Shi, K., Nakamura, T., Obata, T., Yoshizaki, T., Morino, K., Shimizu, S., Nishio, Y., Suzuki, E. and Kashiwagi, A. (2002) Membrane localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 stimulates activities of Akt and atypical protein kinase C but does not stimulate glucose transport and glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **277**, 38863-38869.

Ekblom, J., Gronvall, J., Lennernast, B., Nilsson, S., Garpenstrand, H. and Oreland, L. (1999) Elevated activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase in blood from patients with skeletal metastases of prostate cancer. *Clin Sci (Lond)*, **97**, 111-115.

El Hadri, K., Moldes, M., Mercier, N., Andreani, M., Pairault, J. and Feve, B. (2002)

Semicarbazide-sensitive amine oxidase in vascular smooth muscle cells: differentiation-dependent expression and role in glucose uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 89-94.

Elberg, G., He, Z., Li, J., Sekar, N. and Shechter, Y. (1997) Vanadate activates membranous nonreceptor protein tyrosine kinase in rat adipocytes. *Diabetes*, **46**, 1684-1690.

Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L. and Kennedy, B.P. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, **283**, 1544-1548.

Elliott, J., Callingham, B.A. and Sharman, D.F. (1992) Amine oxidase enzymes of sheep blood vessels and blood plasma: a comparison of their properties. *Comp Biochem Physiol C*, **102**, 83-89.

Enrique-Tarancón, G., Marti, L., Morin, N., Lizcano, J.M., Unzeta, M., Sevilla, L., Camps, M., Palacin, M., Testar, X., Carpene, C. and Zorzano, A. (1998) Role of semicarbazide-sensitive amine oxidase on glucose transport and GLUT4 recruitment to the cell surface in adipose cells. *J Biol Chem*, **273**, 8025-8032.

Eyre, D.R., Paz, M.A. and Gallop, P.M. (1984) Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem*, **53**, 717-748.

Fantus, I.G., Kadota, S., Deragon, G., Foster, B. and Posner, B.I. (1989) Pervanadate [peroxide(s) of vanadate] mimics insulin action in rat adipocytes via activation of the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemistry*, **28**, 8864-8871.

Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M. and Paschke, R. (2001) Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 1027-1031.

Fernandez de Arriba, A., Lizcano, J.M., Balsa, D. and Unzeta, M. (1991) Contribution of different amine oxidases to the metabolism of dopamine in bovine retina. *Biochem Pharmacol*, **42**, 2355-2361.

Ferrer, I., Lizcano, J.M., Hernandez, M. and Unzeta, M. (2002) Overexpression of semicarbazide sensitive amine oxidase in the cerebral blood vessels in patients with Alzheimer's disease and cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Neurosci Lett*, **321**, 21-24.

Ferri, C., Desideri, G., Valenti, M., Bellini, C., Pasin, M., Santucci, A. and De Mattia, G. (1999) Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertension*, **34**, 568-573.

Fingar, D.C., Hausdorff, S.F., Blenis, J. and Birnbaum, M.J. (1993) Dissociation of pp70 ribosomal protein S6 kinase from insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **268**, 3005-3008.

Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 248-253.

Fischer, Y., Thomas, J., Sevilla, L., Munoz, P., Becker, C., Holman, G., Kozka, I.J., Palacin, M., Testar, X., Kammermeier, H. and Zorzano, A. (1997) Insulin-induced recruitment of

glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol Chem*, **272**, 7085-7092.

Flier, J.S. (1998) Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 1407-1413.

Foley, J.E. and Hueckstead, T.P. (1984) Glucose 6-phosphate effects on deoxyglucose, glucose and methylglucose transport in rat adipocytes. Evidence for intracellular regulation of sugar transport by glucose metabolites. *Biochim Biophys Acta*, **805**, 313-316.

Fontana, E., Boucher, J., Marti, L., Lizcano, J.M., Testar, X., Zorzano, A. and Carpene, C. (2001) Amine oxidase substrates mimic several of the insulin effects on adipocyte differentiation in 3T3-F442A cells. *Biochem J*, **356**, 769-777.

Fowler, C.J. and Tipton, K.F. (1981) Concentration dependence of the oxidation of tyramine by the two forms of rat liver mitochondrial monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol*, **30**, 3329-3332.

Fraticelli, A., Serrano, C.V., Jr., Bochner, B.S., Capogrossi, M.C. and Zweier, J.L. (1996) Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochim Biophys Acta*, **1310**, 251-259.

Frebort, I., Tamaki, H., Ishida, H., Pec, P., Luhova, L., Tsuno, H., Halata, M., Asano, Y., Kato, Y., Matsushita, K., Toyama, H., Kumagai, H. and Adachi, O. (1996) Two distinct quinoprotein amine oxidases are induced by n-butylamine in the mycelia of Aspergillus niger AKU 3302. Purification, characterization, cDNA cloning and sequencing. *Eur J Biochem*, **237**, 255-265.

Frevert, E.U. and Kahn, B.B. (1997) Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*, **17**, 190-198.

Fried, S.K., Bunkin, D.A. and Greenberg, A.S. (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 847-850.

Friedman, J.M. and Halaas, J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395**, 763-770.

Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E. and Lodish, H.F. (2001) Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2005-2010.

Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F.J. and Burrell, M.A. (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **280**, E827-847.

Fruhbeck, G., Jebb, S.A. and Prentice, A.M. (1998) Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol*, **18**, 399-419.

Garpenstrand, H., Ekblom, J., Backlund, L.B., Oreland, L. and Rosenqvist, U. (1999) Elevated plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in Type 2 diabetes *mellitus* complicated by retinopathy. *Diabet Med*, **16**, 514-521.

Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Leon, L.R., Vinson, C. and Reitman, M.L. (2000) Leptin and diabetes in lipoatrophic mice. *Nature*, **403**, 850; discussion 850-851.

Glikman, P.L., Manni, A., Bartholomew, M. and Demers, L. (1990) Polyamine involvement in basal and estradiol-stimulated insulin-like growth factor I secretion and action in breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **37**, 1-10.

Gogg, S., Chen, J., Efendic, S., Smith, U. and Ostenson, C. (2001) Effects of phosphotyrosine phosphatase inhibition on insulin secretion and intracellular signaling events in rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 1161-1168.

Goldfine, A.B., Simonson, D.C., Folli, F., Patti, M.E. and Kahn, C.R. (1995) Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes *mellitus in vivo* and *in vitro* studies. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 3311-3320.

Goldstein, B.J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M.F. and Harbeck, M. (2000) Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J Biol Chem*, **275**, 4283-4289.

Goto, Y., Kakizaki, M. and Masaki, N. (1976) Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med*, **119**, 85-90.

Goto, Y., Kida, K., Ikeuchi, M., Kaino, Y. and Matsuda, H. (1992) Synergism in insulin-like effects of molybdate plus H2O2 or tungstate plus H2O2 on glucose transport by isolated rat adipocytes. *Biochem Pharmacol*, **44**, 174-177.

Green, A. (1986) The insulin-like effect of sodium vanadate on adipocyte glucose transport is mediated at a post-insulin-receptor level. *Biochem J*, **238**, 663-669.

Green, H. and Meuth, M. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, **3**, 127-133.

Gumà, A., Mora, C., Santalucia, T., Vinals, F., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A. (1992) System A transport activity is stimulated in skeletal muscle in response to diabetes. *FEBS Lett*, **310**, 51-54.

Gupta, N., Scharenberg, A.M., Fruman, D.A., Cantley, L.C., Kinet, J.P. and Long, E.O. (1999) The SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) recruits the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase during FcgammaRIIb1-mediated inhibition of B cell receptor signaling. *J Biol Chem*, **274**, 7489-7494.

Gustafson, T.A., He, W., Craparo, A., Schaub, C.D. and O'Neill, T.J. (1995) Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol*, **15**, 2500-2508.

Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K. and Friedman, J.M. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, **269**, 543-546.

Hansson, M., Asea, A., Ersson, U., Hermodsson, S. and Hellstrand, K. (1996) Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J Immunol*, **156**, 42-47.

Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Kotani, K., Kojima, A., Waterfield, M.D. and Kasuga, M. (1995) Normal activation of p70 S6 kinase by insulin in cells overexpressing dominant negative 85kD subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **208**, 735-741.

Harris, M.I., Flegal, K.M., Cowie, C.C., Eberhardt, M.S., Goldstein, D.E., Little, R.R., Wiedmeyer, H.M. and Byrd-Holt, D.D. (1998) Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care*, **21**, 518-524.

Hartmann, C., Brzovic, P. and Klinman, J.P. (1993) Spectroscopic detection of chemical intermediates in the reaction of para-substituted benzylamines with bovine serum amine oxidase. *Biochemistry*, **32**, 2234-2241.

Haruta, T., Morris, A.J., Rose, D.W., Nelson, J.G., Mueckler, M. and Olefsky, J.M. (1995) Insulin-stimulated GLUT4 translocation is mediated by a divergent intracellular signaling pathway. *J Biol Chem*, **270**, 27991-27994.

Hashiramoto, M. and James, D.E. (2000) Characterization of insulin-responsive GLUT4 storage vesicles isolated from 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*, **20**, 416-427.

Haugen, F., Jorgensen, A., Drevon, C.A. and Trayhurn, P. (2001) Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*, **507**, 105-108.

Hayes, B.E. and Clarke, D.E. (1990) Semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in streptozotocin diabetic rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, **69**, 71-83.

Hayes, G.R. and Lockwood, D.H. (1987) Role of insulin receptor phosphorylation in the insulinomimetic effects of hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8115-8119.

Heffetz, D., Bushkin, I., Dror, R. and Zick, Y. (1990) The insulinomimetic agents H2O2 and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem*, **265**, 2896-2902.

Heffetz, D., Rutter, W.J. and Zick, Y. (1992) The insulinomimetic agents H2O2 and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. *Biochem J*, **288 (Pt 2)**, 631-635.

Heuser, J.E. and Anderson, R.G. (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol*, **108**, 389-400.

Heyliger, C.E., Tahiliani, A.G. and McNeill, J.H. (1985) Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science*, **227**, 1474-1477.

Hogdall, E.V., Houen, G., Borre, M., Bundgaard, J.R., Larsson, L.I. and Vuust, J. (1998) Structure and tissue-specific expression of genes encoding bovine copper amine oxidases. *Eur J Biochem*, **251**, 320-328.

Holcomb, I.N., Kabakoff, R.C., Chan, B., Baker, T.W., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, H.B., Wright, B.D., Skelton, N.J., Frantz, G.D., Tumas, D.B., Peale, F.V., Jr.,

Shelton, D.L. and Hebert, C.C. (2000) FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *Embo J*, **19**, 4046-4055.

Holt, A., Alton, G., Scaman, C.H., Loppnow, G.R., Szpacenko, A., Svendsen, I. and Palcic, M.M. (1998) Identification of the quinone cofactor in mammalian semicarbazide- sensitive amine oxidase. *Biochemistry*, **37**, 4946-4957.

Holt, A., Sharman, D.F., Baker, G.B. and Palcic, M.M. (1997) A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal Biochem*, **244**, 384-392.

Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L. and Spiegelman, B.M. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, **95**, 2409-2415.

Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F. and Spiegelman, B.M. (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*, **271**, 665-668.

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.

Hotamisligil, G.S. and Spiegelman, B.M. (1994) Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, **43**, 1271-1278.

Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T. and Matsuzawa, Y. (2000) Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1595-1599.

Hotta, K., Funahashi, T., Bodkin, N.L., Ortmeyer, H.K., Arita, Y., Hansen, B.C. and Matsuzawa, Y. (2001) Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, **50**, 1126-1133.

Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M.J. and Ramachandran, C. (1997) Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem*, **272**, 843-851.

Hysmith, R.M. and Boor, P.J. (1987) *In vitro* expression of benzylamine oxidase activity in cultured porcine smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, **9**, 668-674.

Hysmith, R.M. and Boor, P.J. (1988) Purification of benzylamine oxidase from cultured porcine aortic smooth muscle cells. *Biochem Cell Biol*, **66**, 821-829.

Imamura, Y., Kubota, R., Wang, Y., Asakawa, S., Kudoh, J., Mashima, Y., Oguchi, Y. and Shimizu, N. (1997) Human retina-specific amine oxidase (RAO): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics*, **40**, 277-283.

Imamura, Y., Noda, S., Mashima, Y., Kudoh, J., Oguchi, Y. and Shimizu, N. (1998) Human

retina-specific amine oxidase: genomic structure of the gene (AOC2), alternatively spliced variant, and mRNA expression in retina. *Genomics*, **51**, 293-298.

Irjala, H., Salmi, M., Alanen, K., Grenman, R. and Jalkanen, S. (2001) Vascular adhesion protein 1 mediates binding of immunotherapeutic effector cells to tumor endothelium. *J Immunol*, **166**, 6937-6943.

Iwabuki, H., Matsumura, K., Mure, M., Kuroda, S. and Tanizawa, K. (1998) Molecular cloning of semicarbazide-sensitive amine oxidase gene from Bovine aorta. *NCBI, Direct Submission*.

Jaakkola, K., Jalkanen, S., Kaunismaki, K., Vanttinen, E., Saukko, P., Alanen, K., Kallajoki, M., Voipio-Pulkki, L.M. and Salmi, M. (2000) Vascular adhesion protein-1, intercellular adhesion molecule-1 and P- selectin mediate leukocyte binding to ischemic heart in humans. *J Am Coll Cardiol*, **36**, 122-129.

Jaakkola, K., Kaunismaki, K., Tohka, S., Yegutkin, G., Vanttinen, E., Havia, T., Pelliniemi, L.J., Virolainen, M., Jalkanen, S. and Salmi, M. (1999) Human vascular adhesion protein-1 in smooth muscle cells. *Am J Pathol*, **155**, 1953-1965.

Jackson, T.K., Salhanick, A.I., Sparks, J.D., Sparks, C.E., Bolognino, M. and Amatruda, J.M. (1988) Insulin-mimetic effects of vanadate in primary cultures of rat hepatocytes. *Diabetes*, **37**, 1234-1240.

Jacobson, M.D. (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci*, **21**, 83-86.

Jalkanen, S. and Salmi, M. (2001) Cell surface monoamine oxidases: enzymes in search of a function. *Embo J*, **20**, 3893-3901.

Janes, S.M., Mu, D., Wemmer, D., Smith, A.J., Kaur, S., Maltby, D., Burlingame, A.L. and Klinman, J.P. (1990) A new redox cofactor in eukaryotic enzymes: 6-hydroxydopa at the active site of bovine serum amine oxidase. *Science*, **248**, 981-987.

Janke, J., Engeli, S., Gorzelniak, K., Luft, F.C. and Sharma, A.M. (2002) Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res*, **10**, 1-5.

Jhun, B.H., Rampal, A.L., Liu, H., Lachaal, M. and Jung, C.Y. (1992) Effects of insulin on steady state kinetics of GLUT4 subcellular distribution in rat adipocytes. Evidence of constitutive GLUT4 recycling. *J Biol Chem*, **267**, 17710-17715.

Johnston, B., Kanwar, S. and Kubes, P. (1996) Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanisms including NO. *Am J Physiol*, **271**, H614-621.

Jones, D.J. and Burnett, P.C. (1975) Creatine metabolism and toxicity. *Kidney Int*, **7**, S294-S298.

Juan, C.C., Au, L.C., Fang, V.S., Kang, S.F., Ko, Y.H., Kuo, S.F., Hsu, Y.P., Kwok, C.F. and Ho, L.T. (2001) Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 1328-1333.

Kaburagi, Y., Satoh, S., Tamemoto, H., Yamamoto-Honda, R., Tobe, K., Veki, K., Yamauchi, T.,

Kono-Sugita, E., Sekihara, H., Aizawa, S., Cushman, S.W., Akanuma, Y., Yazaki, Y. and Kadowaki, T. (1997) Role of insulin receptor substrate-1 and pp60 in the regulation of insulin-induced glucose transport and GLUT4 translocation in primary adipocytes. *J Biol Chem*, **272**, 25839-25844.

Kadota, S., Fantus, I.G., Deragon, G., Guyda, H.J., Hersh, B. and Posner, B.I. (1987) Peroxide(s) of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **147**, 259-266.

Kagan, H.M., Williams, M.A., Williamson, P.R. and Anderson, J.M. (1984) Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates. *J Biol Chem*, **259**, 11203-11207.

Kahn, B.B. and Flier, J.S. (2000) Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, **106**, 473-481.

Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J.L., Friedman, J.M. and Charron, M.J. (1997) Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, **389**, 374-377.

Kanoh, Y., Bandyopadhyay, G., Sajan, M.P., Standaert, M.L. and Farese, R.V. (2000) Thiazolidinedione treatment enhances insulin effects on protein kinase C-zeta /lambda activation and glucose transport in adipocytes of nondiabetic and Goto-Kakizaki type II diabetic rats. *J Biol Chem*, **275**, 16690-16696.

Kasuga, M., Akanuma, Y., Iwamoto, Y. and Kosaka, K. (1978) Insulin binding and glucose metabolism in adipocytes of streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol*, **235**, E175-182.

Katagiri, H., Asano, T., Ishihara, H., Inukai, K., Shibasaki, Y., Kikuchi, M., Yazaki, Y. and Oka, Y. (1996) Overexpression of catalytic subunit p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase increases glucose transport activity with translocation of glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **271**, 16987-16990.

Khan, A.H. and Pessin, J.E. (2002) Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*, **45**, 1475-1483.

Kim, K.H., Lee, K., Moon, Y.S. and Sul, H.S. (2001) A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **276**, 11252-11256.

Kimura, K., Toyota, T., Kakizaki, M., Kudo, M., Takebe, K. and Goto, Y. (1982) Impaired insulin secretion in the spontaneous diabetes rats. *Tohoku J Exp Med*, **137**, 453-459.

Kitahara, A., Toyota, T., Kakizaki, M. and Goto, Y. (1978) Activities of hepatic enzymes in spontaneous diabetes rats produced by selective breeding of normal *Wistar* rats. *Tohoku J Exp Med*, **126**, 7-11.

Klinman, J.P. (1996) New quinocofactors in eukaryotes. *J Biol Chem*, **271**, 27189-27192.

Klinman, J.P. and Mu, D. (1994) Quinoenzymes in biology. *Annu Rev Biochem*, **63**, 299-344.

Klippel, A., Kavanaugh, W.M., Pot, D. and Williams, L.T. (1997) A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol*, **17**, 338-344.

Kobayashi, M. and Olefsky, J.M. (1979) Effects of streptozotocin-induced diabetes on insulin binding, glucose transport, and intracellular glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *Diabetes*, **28**, 87-95.

Koshio, O., Akanuma, Y. and Kasuga, M. (1988) Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in intact cells. *Biochem J*, **250**, 95-101.

Kremerskothen, J. and Barnekow, A. (1993) Determination of phosphotyrosine phosphatase (PTPase) activity in normal and transformed cells. *Mol Cell Biochem*, **125**, 1-9.

Krieger-Brauer, H.I. and Kather, H. (1992) Human fat cells possess a plasma membrane-bound H2O2-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest*, **89**, 1006-1013.

Krieger-Brauer, H.I. and Kather, H. (1995) Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families on adipose conversion and NADPH-dependent H2O2 generation in 3T3 L1-cells. *Biochem J*, **307 (Pt 2)**, 549-556.

Krook, A., Kawano, Y., Song, X.M., Efendic, S., Roth, R.A., Wallberg-Henriksson, H. and Zierath, J.R. (1997) Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetes*, **46**, 2110-2114.

Kuczmarski, R.J., Flegal, K.M., Campbell, S.M. and Johnson, C.L. (1994) Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *Jama*, **272**, 205-211.

Kunsch, C. and Medford, R.M. (1999) Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res*, **85**, 753-766.

Kurkijarvi, R., Adams, D.H., Leino, R., Mottonen, T., Jalkanen, S. and Salmi, M. (1998) Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): increased serum levels in inflammatory liver diseases. *J Immunol*, **161**, 1549-1557.

Kurkijarvi, R., Jalkanen, S., Isoniemi, H. and Salmi, M. (2001) Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) mediates lymphocyte-endothelial interactions in chronic kidney rejection. *Eur J Immunol*, **31**, 2876-2884.

Kurkijarvi, R., Yegutkin, G.G., Gunson, B.K., Jalkanen, S., Salmi, M. and Adams, D.H. (2000) Circulating soluble vascular adhesion protein 1 accounts for the increased serum monoamine oxidase activity in chronic liver disease. *Gastroenterology*, **119**, 1096-1103.

Lalor, P.F., Edwards, S., McNab, G., Salmi, M., Jalkanen, S. and Adams, D.H. (2002) Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol*, **169**, 983-992.

Lang, C.H., Dobrescu, C. and Bagby, G.J. (1992) Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology*, **130**, 43-52.

Langford, S.D., Trent, M.B., Balakumaran, A. and Boor, P.J. (1999) Developmental vasculotoxicity associated with inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Toxicol Appl Pharmacol*, **155**, 237-244.

Langford, S.D., Trent, M.B. and Boor, P.J. (2001) Cultured rat vascular smooth muscle cells are resistant to methylamine toxicity: no correlation to semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Cardiovasc Toxicol*, **1**, 51-60.

Langford, S.D., Trent, M.B. and Boor, P.J. (2002) Semicarbazide-sensitive amine oxidase and extracellular matrix deposition by smooth-muscle cells. *Cardiovasc Toxicol*, **2**, 141-150.

Lasky, L.A. (1995) Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem*, **64**, 113-139.

Lavan, B.E., Fantin, V.R., Chang, E.T., Lane, W.S., Keller, S.R. and Lienhard, G.E. (1997) A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem*, **272**, 21403-21407.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, **16**, 4743-4751.

Leighton, B., Cooper, G.J., DaCosta, C. and Foot, E.A. (1991) Peroxovanadates have full insulin-like effects on glycogen synthesis in normal and insulin-resistant skeletal muscle. *Biochem J*, **276 (Pt 2)**, 289-292.

Leung, K.H. (1999) Release of soluble ICAM-1 from human lung fibroblasts, aortic smooth muscle cells, dermal microvascular endothelial cells, bronchial epithelial cells, and keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **260**, 734-739.

Lewinsohn, R. (1977) Human serum amine oxidase. Enzyme activity in severely burnt patients and in patients with cancer. *Clin Chim Acta*, **81**, 247-256.

Lewinsohn, R. (1984) Mammalian monoamine-oxidizing enzymes, with special reference to benzylamine oxidase in human tissues. *Braz J Med Biol Res*, **17**, 223-256.

Ling, Z.C., Hong-Lie, C., Ostenson, C.G., Efendic, S. and Khan, A. (2001) Hyperglycemia contributes to impaired insulin response in GK rat islets. *Diabetes*, **50 Suppl 1**, S108-112.

Lingueglia, E., Renard, S., Voilley, N., Waldmann, R., Chassande, O., Lazdunski, M. and Barbry, P. (1993) Molecular cloning and functional expression of different molecular forms of rat amiloride-binding proteins. *Eur J Biochem*, **216**, 679-687.

Liu, L., Karkanias, G.B., Morales, J.C., Hawkins, M., Barzilai, N., Wang, J. and Rossetti, L. (1998a) Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J Biol Chem*, **273**, 31160-31167.

Liu, L.S., Spelleken, M., Rohrig, K., Hauner, H. and Eckel, J. (1998b) Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes*, **47**, 515-522.

Livingstone, C., James, D.E., Rice, J.E., Hanpeter, D. and Gould, G.W. (1996) Compartment ablation analysis of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, **315 (Pt 2)**, 487-495.

Lizcano, J.M., Escrich, E., Ribalta, T., Muntane, J. and Unzeta, M. (1991) Amine oxidase activities in rat breast cancer induced experimentally with 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene. *Biochem Pharmacol*, **42**, 263-269.

Lizcano, J.M., Tipton, K.F. and Unzeta, M. (1998) Purification and characterization of membrane-bound semicarbazide- sensitive amine oxidase (SSAO) from bovine lung.

Biochem J, **331**, 69-78.

Lizcano, J.M. and Unzeta, M. (2000) On the primary structure of membrane-bound semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO). *Neurobiology*, **8**, 37-46.

Llobet, J.M. and Domingo, J.L. (1984) Acute toxicity of vanadium compounds in rats and mice. *Toxicol Lett*, **23**, 227-231.

Lonnroth, P., Eriksson, J.W., Posner, B.I. and Smith, U. (1993) Peroxovanadate but not vanadate exerts insulin-like effects in human adipocytes. *Diabetologia*, **36**, 113-116.

Lyles, G.A. (1996) Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. *Int J Biochem Cell Biol*, **28**, 259-274.

Lyles, G.A. and Bertie, K.H. (1987) Properties of a semicarbazide-sensitive amine oxidase in rat articular cartilage. *Pharmacol Toxicol*, **60**, (Suppl. 1), 33.

Lyles, G.A. and Chalmers, J. (1992) The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide- sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem Pharmacol*, **43**, 1409-1414.

Lyles, G.A. and Fitzpatrick, C.M. (1985) An allylamine derivative (MDL 72145) with potent irreversible inhibitory actions on rat aorta semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Pharm Pharmacol*, **37**, 329-335.

Lyles, G.A. and Singh, I. (1985) Vascular smooth muscle cells: a major source of the semicarbazide- sensitive amine oxidase of the rat aorta. *J Pharm Pharmacol*, **37**, 637-643.

MacDougald, O.A., Hwang, C.S., Fan, H. and Lane, M.D. (1995) Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9034-9037.

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.

Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L. and Goldstein, B.J. (2001) Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b *in vivo* and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem*, **276**, 21938-21942.

Maquoi, E., Demeulemeester, D., Voros, G., Collen, D. and Roger Lijnen, H. (2003) Enhanced nutritionally induced adipose tissue development in mice with stromelysin-1 gene inactivation. *Thromb Haemost*, **89**, 696-704.

Maquoi, E., Munaut, C., Colige, A., Collen, D. and Lijnen, H.R. (2002) Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. *Diabetes*, **51**, 1093-1101.

Martelius, T., Salmi, M., Wu, H., Bruggeman, C., Hockerstedt, K., Jalkanen, S. and Lautenschlager, I. (2000) Induction of vascular adhesion protein-1 during liver allograft rejection and concomitant cytomegalovirus infection in rats. *Am J Pathol*, **157**, 1229-

1237.

Marti, L., Morin, N., Enrique-Tarancón, G., Prevot, D., Lafontan, M., Testar, X., Zorzano, A. and Carpene, C. (1998) Tyramine and vanadate synergistically stimulate glucose transport in rat adipocytes by amine oxidase-dependent generation of hydrogen peroxide. *J Pharmacol Exp Ther*, **285**, 342-349.

Martin, S., Millar, C.A., Lyttle, C.T., Meerloo, T., Marsh, B.J., Gould, G.W. and James, D.E. (2000) Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation. *J Cell Sci*, **113 Pt 19**, 3427-3438.

Martinez, J.A., Margareto, J., Marti, A., Milagro, F.I., Larrarte, E. and Moreno Aliaga, M.J. (2001) Resistin overexpression is induced by a beta3 adrenergic agonist in diet-related overweightness. *J Physiol Biochem*, **57**, 287-288.

Martins, R.P., Ujfalusi, A.A., Csiszar, K. and Krawetz, S.A. (2001) Characterization of the region encompassing the human lysyl oxidase locus. *DNA Seq*, **12**, 215-227.

Mathys, K.C., Ponnampalam, S.N., Padival, S. and Nagaraj, R.H. (2002) Semicarbazide-sensitive amine oxidase in aortic smooth muscle cells mediates synthesis of a methylglyoxal-AGE: implications for vascular complications in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 863-869.

McEwen, C.M., Jr. and Castell, D.O. (1967) Abnormalities of serum monoamine oxidase in chronic liver disease. *J Lab Clin Med*, **70**, 36-47.

McNeill, J.H., Delgatty, H.L. and Battell, M.L. (1991) Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, **40**, 1675-1678.

Mercier, N., Moldes, M., El Hadri, K. and Feve, B. (2001) Semicarbazide-sensitive amine oxidase activation promotes adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochem J*, **358**, 335-342.

Mercier, N., Moldes, M., Hadri, K.E. and Feve, B. (2003) Regulation of Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase Expression by Tumor Necrosis Factor-alpha in Adipocytes: Functional Consequences on Glucose Transport. *J Pharmacol Exp Ther*, **304**, 1197-1208.

Meszaros, Z., Szombathy, T., Raimondi, L., Karadi, I., Romics, L. and Magyar, K. (1999) Elevated serum semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in non- insulin-dependent diabetes *mellitus*: correlation with body mass index and serum triglyceride. *Metabolism*, **48**, 113-117.

Meyerovitch, J., Farfel, Z., Sack, J. and Shechter, Y. (1987) Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. Characterization and mode of action. *J Biol Chem*, **262**, 6658-6662.

Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Muller, C., Carling, D. and Kahn, B.B. (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, **415**, 339-343.

Misra, U.K., Chu, C.T., Rubenstein, D.S., Gawdi, G. and Pizzo, S.V. (1993) Receptor-recognized alpha 2-macroglobulin-methylamine elevates intracellular calcium, inositol phosphates and cyclic AMP in murine peritoneal macrophages. *Biochem J*, **290 (Pt 3)**,

885-891.

Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Bulmer, K., Holly, J.M., Yudkin, J.S. and Coppack, S.W. (1999) Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue *in vivo*. *Am J Physiol*, **277**, E971-975.

Moitra, J., Mason, M.M., Olive, M., Krylov, D., Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Feigenbaum, L., Lee, E., Aoyama, T., Eckhaus, M., Reitman, M.L. and Vinson, C. (1998) Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev*, **12**, 3168-3181.

Moldes, M., Feve, B. and Pairault, J. (1999) Molecular cloning of a major mRNA species in murine 3T3 adipocyte lineage. differentiation-dependent expression, regulation, and identification as semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Biol Chem*, **274**, 9515-9523.

Moller, S.G. and McPherson, M.J. (1995) Molecular and functional studies of copper amine oxidase from Arabidopsis thaliana. *Biochem Soc Trans*, **23**, 630S.

Monnier, V.M., Sell, D.R., Nagaraj, R.H., Miyata, S., Grandhee, S., Odetti, P. and Ibrahim, S.A. (1992) Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes*, **41 Suppl 2**, 36-41.

Moodie, S.A., Alleman-Sposeto, J. and Gustafson, T.A. (1999) Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate. *J Biol Chem*, **274**, 11186-11193.

Mooney, R.A., Bordwell, K.L., Luhowskyj, S. and Casnellie, J.E. (1989) The insulin-like effect of vanadate on lipolysis in rat adipocytes is not accompanied by an insulin-like effect on tyrosine phosphorylation. *Endocrinology*, **124**, 422-429.

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.

Morin, N., Lizcano, J.M., Fontana, E., Marti, L., Smih, F., Rouet, P., Prevot, D., Zorzano, A., Unzeta, M. and Carpene, C. (2001) Semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates stimulate glucose transport and inhibit lipolysis in human adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **297**, 563-572.

Morin, N., Visentin, V., Calise, D., Marti, L., Zorzano, A., Testar, X., Valet, P., Fischer, Y. and Carpene, C. (2002) Tyramine stimulates glucose uptake in insulin-sensitive tissues *in vitro* and *in vivo* via its oxidation by amine oxidases. *J Pharmacol Exp Ther*, **303**, 1238-1247.

Morris, N.J., Ducret, A., Aebersold, R., Ross, S.A., Keller, S.R. and Lienhard, G.E. (1997) Membrane amine oxidase cloning and identification as a major protein in the adipocyte plasma membrane. *J Biol Chem*, **272**, 9388-9392.

Morrison, R.F. and Farmer, S.R. (2000) Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr*, **130**, 3116S-3121S.

Mu, D., Janes, S.M., Smith, A.J., Brown, D.E., Dooley, D.M. and Klinman, J.P. (1992) Tyrosine codon corresponds to topa quinone at the active site of copper amine oxidases. *J Biol Chem*, **267**, 7979-7982.

Mu, D., Medzihradszky, K.F., Adams, G.W., Mayer, P., Hines, W.M., Burlingame, A.L., Smith,

A.J., Cai, D. and Klinman, J.P. (1994) Primary structures for a mammalian cellular and serum copper amine oxidase. *J Biol Chem*, **269**, 9926-9932.

Mukherjee, S.P. (1980) Mediation of the antilipolytic and lipogenic effects of insulin in adipocytes by intracellular accumulation of hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol*, **29**, 1239-1246.

Mukherjee, S.P. and Lynn, W.S. (1977) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in adipocyte plasma membrane and its activation by insulin. Possible role in the hormone's effects on adenylate cyclase and the hexose monophosphate shunt. *Arch Biochem Biophys*, **184**, 69-76.

Muller, G., Ertl, J., Gerl, M. and Preibisch, G. (1997) Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, **272**, 10585-10593.

Nagaev, I. and Smith, U. (2001) Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 561-564.

Nagasaka, S., Ishikawa, S., Nakamura, T., Kawakami, A., Rokkaku, K., Hayashi, H., Kusaka, I., Higashiyama, M. and Saito, T. (1998) Association of endogenous insulin secretion and mode of therapy with body fat and serum leptin levels in diabetic subjects. *Metabolism*, **47**, 1391-1396.

Nelson, B.A., Robinson, K.A. and Buse, M.G. (2000) High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, **49**, 981-991.

Neudauer, C.L., Joberty, G., Tatsis, N. and Macara, I.G. (1998) Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr Biol*, **8**, 1151-1160.

Nilsson, S.E., Tryding, N. and Tufvesson, G. (1968) Serum monoamine oxidase (MAO) in diabetes *mellitus* and some other internal diseases. *Acta Med Scand*, **184**, 105-108.

Norqvist, A., Fowler, C.J. and Oreland, L. (1981) The deamination of monoamines by pig dental pulp. *Biochem Pharmacol*, **30**, 403-409.

O'Brien, R.E., Panangiotopoulos, S., Cooper, M.S. and Jerums, G. (1992) Anti-atherogenic effect of aminoguanidine, an inibitor of advanced glycation. *Diabetes*, **4 (Suppl 1)**, 16A.

Okada, T., Kawano, Y., Sakakibara, T., Hazeki, O. and Ui, M. (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem*, **269**, 3568-3573.

Okado, A., Kawasaki, Y., Hasuike, Y., Takahashi, M., Teshima, T., Fujii, J. and Taniguchi, N. (1996) Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in macrophage-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 219-224.

Olefsky, J.M. and Kobayashi, M. (1978) Mechanisms of fasting-induced increase in insulin binding to rat adipocytes. *J Clin Invest*, **61**, 329-338.

Ostenson, C.G., Sandberg-Nordqvist, A.C., Chen, J., Hallbrink, M., Rotin, D., Langel, U. and Efendic, S. (2002) Overexpression of protein-tyrosine phosphatase PTP sigma is linked to impaired glucose-induced insulin secretion in hereditary diabetic Goto-Kakizaki rats.

Biochem Biophys Res Commun, **291**, 945-950.

Otsuka, D. and Kobayashi, Y. (1964) A radioisotopic assay for monoamine oxidase determinations in human plasma. *Biocemical Pharmacology*, **13**, 995-1006.

Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, **100**, 2473-2476.

Panchenko, M.V., Stetler-Stevenson, W.G., Trubetskoy, O.V., Gacheru, S.N. and Kagan, H.M. (1996) Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J Biol Chem*, **271**, 7113-7119.

Paquet, M.R., Romanek, R.J. and Sargeant, R.J. (1992) Vanadate induces the recruitment of GLUT-4 glucose transporter to the plasma membrane of rat adipocytes. *Mol Cell Biochem*, **109**, 149-155.

Parsons, M.R., Convery, M.A., Wilmot, C.M., Yadav, K.D., Blakeley, V., Corner, A.S., Phillips, S.E., McPherson, M.J. and Knowles, P.F. (1995) Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of Escherichia coli at 2 A resolution. *Structure*, **3**, 1171-1184.

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.

Peraldi, P., Xu, M. and Spiegelman, B.M. (1997) Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest*, **100**, 1863-1869.

Pessin, J.E., Thurmond, D.C., Elmendorf, J.S., Coker, K.J. and Okada, S. (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem*, **274**, 2593-2596.

Petersen, K.F., Hendler, R., Price, T., Perseghin, G., Rothman, D.L., Held, N., Amatruda, J.M. and Shulman, G.I. (1998) 13C/31P NMR studies on the mechanism of insulin resistance in obesity. *Diabetes*, **47**, 381-386.

Pietrangeli, P., Nocera, S., Fattibene, P., Wang, X., Mondovi, B. and Morpurgo, L. (2000) Modulation of bovine serum amine oxidase activity by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*, **267**, 174-178.

Pilgeram, L. (1993) Atherogenesis and fibrinogen: historical perspective and current status. *Naturwissenschaften*, **80**, 547-555.

Piper, R.C., James, D.E., Slot, J.W., Puri, C. and Lawrence, J.C., Jr. (1993) GLUT4 phosphorylation and inhibition of glucose transport by dibutyryl cAMP. *J Biol Chem*, **268**, 16557-16563.

Pizzinat, N., Chan, S.L., Remaury, A., Morgan, N.G. and Parini, A. (1999a) Characterization of monoamine oxidase isoforms in human islets of Langerhans. *Life Sci*, **65**, 441-448.

Pizzinat, N., Marti, L., Remaury, A., Leger, F., Langin, D., Lafontan, M., Carpene, C. and Parini, A. (1999b) High expression of monoamine oxidases in human white adipose tissue:

evidence for their involvement in noradrenaline clearance. *Biochem Pharmacol*, **58**, 1735-1742.

Posner, B.I., Faure, R., Burgess, J.W., Bevan, A.P., Lachance, D., Zhang-Sun, G., Fantus, I.G., Ng, J.B., Hall, D.A., Lum, B.S. and *et al.* (1994) Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J Biol Chem*, **269**, 4596-4604.

Pujades, C., Forsberg, E., Enrich, C. and Johansson, S. (1992) Changes in cell surface expression of fibronectin and fibronectin receptor during liver regeneration. *J Cell Sci*, **102 (Pt 4)**, 815-820.

Pullen, N., Dennis, P.B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S.C., Hemmings, B.A. and Thomas, G. (1998) Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*, **279**, 707-710.

Quash, G., Keolouangkhot, T., Gazzolo, L., Ripoll, H. and Saez, S. (1979) Diamine oxidase and polyamine oxidase activities in normal and transformed cells. *Biochem J*, **177**, 275-282.

Raimondi, L., Pirisino, R., Banchelli, G., Ignesti, G., Conforti, L. and Buffoni, F. (1990) Cultured preadipocytes produce a semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity. *J Neural Transm Suppl*, **32**, 331-336.

Raimondi, L., Pirisino, R., Ignesti, G., Banchelli, G. and Buffoni, F. (1992) A common distribution of the semicarbazide-sensitive amine oxidase activity (SSAO) in white adipose tissue (WAT). *Pharmacol Res*, **25 Suppl 1**, 21-22.

Raimondi, L., Pirisino, R., Ignesti, G., Capecchi, S., Banchelli, G. and Buffoni, F. (1991) Semicarbazide-sensitive amine oxidase activity (SSAO) of rat epididymal white adipose tissue. *Biochem Pharmacol*, **41**, 467-470.

Rameh, L.E. and Cantley, L.C. (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem*, **274**, 8347-8350.

Ramm, G., Slot, J.W., James, D.E. and Stoorvogel, W. (2000) Insulin recruits GLUT4 from specialized VAMP2-carrying vesicles as well as from the dynamic endosomal/trans-Golgi network in rat adipocytes. *Mol Biol Cell*, **11**, 4079-4091.

Rao, G.N., Runge, M.S. and Alexander, R.W. (1995) Hydrogen peroxide activation of cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, **1265**, 67-72.

Ravichandran, L.V., Esposito, D.L., Chen, J. and Quon, M.J. (2001) Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J Biol Chem*, **276**, 3543-3549.

Reaven, G.M., Hollenbeck, C., Jeng, C.Y., Wu, M.S. and Chen, Y.D. (1988) Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes*, **37**, 1020-1024.

Rebrin, K., Steil, G.M., Mittelman, S.D. and Bergman, R.N. (1996) Causal linkage between insulin suppression of lipolysis and suppression of liver glucose output in dogs. *J Clin Invest*, **98**, 741-749.

Reynisdottir, S., Ellerfeldt, K., Wahrenberg, H., Lithell, H. and Arner, P. (1994) Multiple lipolysis

defects in the insulin resistance (metabolic) syndrome. *J Clin Invest*, **93**, 2590-2599.

Ribon, V., Printen, J.A., Hoffman, N.G., Kay, B.K. and Saltiel, A.R. (1998) A novel, multifuntional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*, **18**, 872-879.

Richardson, J.M., Balon, T.W., Treadway, J.L. and Pessin, J.E. (1991) Differential regulation of glucose transporter activity and expression in red and white skeletal muscle. *J Biol Chem*, **266**, 12690-12694.

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.

Roh, J.H., Suzuki, H., Azakami, H., Yamashita, M., Murooka, Y. and Kumagai, H. (1994) Purification, characterization, and crystallization of monoamine oxidase from Escherichia coli K-12. *Biosci Biotechnol Biochem*, **58**, 1652-1656.

Rondinone, C.M., Carvalho, E., Rahn, T., Manganiello, V.C., Degerman, E. and Smith, U.P. (2000) Phosphorylation of PDE3B by phosphatidylinositol 3-kinase associated with the insulin receptor. *J Biol Chem*, **275**, 10093-10098.

Rosen, K.M., Lamperti, E.D. and Villa-Komaroff, L. (1990) Optimizing the northern blot procedure. *Biotechniques*, **8**, 398-403.

Rossetti, L., Massillon, D., Barzilai, N., Vuguin, P., Chen, W., Hawkins, M., Wu, J. and Wang, J. (1997) Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and *in vivo* insulin action. *J Biol Chem*, **272**, 27758-27763.

Rossi, A., Petruzzelli, R. and Agro, A.F. (1992) cDNA-derived amino-acid sequence of lentil seedlings' amine oxidase. *FEBS Lett*, **301**, 253-257.

Rumora, L., Barisic, K., Maysinger, D. and Zanic Grubisic, T. (2003) BpV (phen) induces apoptosis of RINm5F cells by modulation of MAPKs and MKP-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **300**, 877-883.

Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D. (1986) Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*, **44**, 517-518.

Ryzlak, M.T., Ambroziak, W. and Schaffner, C.P. (1992) Human prostatic aldehyde dehydrogenase of healthy controls and diseased prostates. *Biochim Biophys Acta*, **1139**, 287-294.

Saccani, A., Saccani, S., Orlando, S., Sironi, M., Bernasconi, S., Ghezzi, P., Mantovani, A. and Sica, A. (2000) Redox regulation of chemokine receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2761-2766.

Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B. and Auwerx, J. (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, **377**, 527-529.

Salmi, M. and Jalkanen, S. (1992) A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. *Science*, **257**, 1407-1409.

Salmi, M. and Jalkanen, S. (1996) Human vascular adhesion protein 1 (VAP-1) is a unique

sialoglycoprotein that mediates carbohydrate-dependent binding of lymphocytes to endothelial cells. *J Exp Med*, **183**, 569-579.

Salmi, M. and Jalkanen, S. (2001a) Human leukocyte subpopulations from inflamed gut bind to joint vasculature using distinct sets of adhesion molecules. *J Immunol*, **166**, 4650-4657.

Salmi, M. and Jalkanen, S. (2001b) VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends Immunol*, **22**, 211-216.

Salmi, M., Kalimo, K. and Jalkanen, S. (1993) Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation. *J Exp Med*, **178**, 2255-2260.

Salmi, M., Stolen, C., Jousilahti, P., Yegutkin, G.G., Tapanainen, P., Janatuinen, T., Knip, M., Jalkanen, S. and Salomaa, V. (2002) Insulin-regulated increase of soluble vascular adhesion protein-1 in diabetes. *Am J Pathol*, **161**, 2255-2262.

Salmi, M., Tohka, S., Berg, E.L., Butcher, E.C. and Jalkanen, S. (1997) Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) mediates lymphocyte subtype- specific, selectin-independent recognition of vascular endothelium in human lymph nodes. *J Exp Med*, **186**, 589-600.

Salmi, M., Tohka, S. and Jalkanen, S. (2000) Human vascular adhesion protein-1 (VAP-1) plays a critical role in lymphocyte-endothelial cell adhesion cascade under shear. *Circ Res*, **86**, 1245-1251.

Salmi, M., Yegutkin, G.G., Lehvonen, R., Koskinen, K., Salminen, T. and Jalkanen, S. (2001) A cell surface amine oxidase directly controls lymphocyte migration. *Immunity*, **14**, 265-276.

Salminen, T.A., Smith, D.J., Jalkanen, S. and Johnson, M.S. (1998) Structural model of the catalytic domain of an enzyme with cell adhesion activity: human vascular adhesion protein-1 (HVAP-1) D4 domain is an amine oxidase. *Protein Eng*, **11**, 1195-1204.

Saltiel, A.R. (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*, **104**, 517-529.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Savage, D.B., Sewter, C.P., Klenk, E.S., Segal, D.G., Vidal-Puig, A., Considine, R.V. and O'Rahilly, S. (2001) Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*, **50**, 2199-2202.

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.

Schwelberger, H.G., Stalzer, B., Maier, H. and Bodner, E. (1998) Expression and cellular localisation of diamine oxidase in the gastrointestinal tract of pigs. *Inflamm Res*, **47 Suppl 1**, S62-63.

Sciacchitano, S. and Taylor, S.I. (1997) Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. *Endocrinology*, **138**, 4931-4940.

Scott, P.H., Brunn, G.J., Kohn, A.D., Roth, R.A. and Lawrence, J.C., Jr. (1998) Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin

mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7772-7777.

Sesti, G., Federici, M., Hribal, M.L., Lauro, D., Sbraccia, P. and Lauro, R. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *Faseb J*, **15**, 2099-2111.

Sethi, J.K. and Hotamisligil, G.S. (1999) The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 19-29.

Sevilla, L., Tomas, E., Munoz, P., Gumà, A., Fischer, Y., Thomas, J., Ruiz-Montasell, B., Testar, X., Palacin, M., Blasi, J. and Zorzano, A. (1997) Characterization of two distinct intracellular GLUT4 membrane populations in muscle fiber. Differential protein composition and sensitivity to insulin. *Endocrinology*, **138**, 3006-3015.

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.

Shimomura, I., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1998) Insulin resistance and diabetes *mellitus* in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev*, **12**, 3182-3194.

Shisheva, A. and Shechter, Y. (1993a) Mechanism of pervanadate stimulation and potentiation of insulin-activated glucose transport in rat adipocytes: dissociation from vanadate effect. *Endocrinology*, **133**, 1562-1568.

Shisheva, A. and Shechter, Y. (1993b) Role of cytosolic tyrosine kinase in mediating insulin-like actions of vanadate in rat adipocytes. *J Biol Chem*, **268**, 6463-6469.

Shulman, G.I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, **106**, 171-176.

Sivitz, W.I., DeSautel, S.L., Lee, E.C. and Pessin, J.E. (1992) Time-dependent regulation of rat adipose tissue glucose transporter (GLUT4) mRNA and protein by insulin in streptozocin-diabetic and normal rats. *Metabolism*, **41**, 1267-1272.

Sivitz, W.I., Walsh, S.A., Morgan, D.A., Thomas, M.J. and Haynes, W.G. (1997) Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology*, **138**, 3395-3401.

Slot, J.W., Geuze, H.J., Gigengack, S., James, D.E. and Lienhard, G.E. (1991) Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7815-7819.

Smith, D.J., Salmi, M., Bono, P., Hellman, J., Leu, T. and Jalkanen, S. (1998) Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. *J Exp Med*, **188**, 17-27.

Smith, R.M., Charron, M.J., Shah, N., Lodish, H.F. and Jarett, L. (1991) Immunoelectron microscopic demonstration of insulin-stimulated translocation of glucose transporters to the plasma membrane of isolated rat adipocytes and masking of the carboxyl-terminal epitope of intracellular GLUT4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6893-6897.

Smith-Hall, J., Pons, S., Patti, M.E., Burks, D.J., Yenush, L., Sun, X.J., Kahn, C.R. and White,

M.F. (1997) The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry*, **36**, 8304-8310.

Somwar, R., Sumitani, S., Taha, C., Sweeney, G. and Klip, A. (1998) Temporal activation of p70 S6 kinase and Akt1 by insulin: PI 3-kinase-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol*, **275**, E618-625.

Song, X.M., Kawano, Y., Krook, A., Ryder, J.W., Efendic, S., Roth, R.A., Wallberg-Henriksson, H. and Zierath, J.R. (1999) Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. *Diabetes*, **48**, 664-670.

Srivastava, A.K. (2000) Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. *Mol Cell Biochem*, **206**, 177-182.

Standaert, M.L., Ortmeyer, H.K., Sajan, M.P., Kanoh, Y., Bandyopadhyay, G., Hansen, B.C. and Farese, R.V. (2002) Skeletal muscle insulin resistance in obesity-associated type 2 diabetes in monkeys is linked to a defect in insulin activation of protein kinase C-zeta/lambda/iota. *Diabetes*, **51**, 2936-2943.

Steegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H.P., Kleuser, B. and Vestweber, D. (1995) The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*, **373**, 615-620.

Stephens, J.M., Lee, J. and Pilch, P.F. (1997) Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, **272**, 971-976.

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.

Steppan, C.M. and Lazar, M.A. (2002) Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 18-23.

Strausberg, R. (2001) *NCBI, Direct Submission*.

Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B., Buetow, K.H., Schaefer, C.F., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Jordan, H., Moore, T., Max, S.I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A.A., Rubin, G.M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S.S., Loquellano, N.A., Peters, G.J., Abramson, R.D., Mullahy, S.J., Bosak, S.A., McEwan, P.J., McKernan, K.J., Malek, J.A., Gunaratne, P.H., Richards, S., Worley, K.C., Hale, S., Garcia, A.M., Gay, L.J., Hulyk, S.W., Villalon, D.K., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Lu, X., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Ketteman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Young, A.C., Shevchenko, Y., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Touchman, J.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Krzywinski, M.I., Skalska, U., Smailus, D.E., Schnerch, A., Schein,

J.E., Jones, S.J. and Marra, M.A. (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16899-16903.

Strout, H.V., Vicario, P.P., Saperstein, R. and Slater, E.E. (1989) The insulin-mimetic effect of vanadate is not correlated with insulin receptor tyrosine kinase activity nor phosphorylation in mouse diaphragm *in vivo*. *Endocrinology*, **124**, 1918-1924.

Suenaga, T., Hirano, K., Yoshida, A., Motoyashiki, T., Morita, T. and Ueki, H. (2001) Orthovanadate decreases leptin secretion from isolated mouse fat pads. *Biol Pharm Bull*, **24**, 327-331.

Sugino, H., Sasaki, M., Azakami, H., Yamashita, M. and Murooka, Y. (1992) A monoamine-regulated Klebsiella aerogenes operon containing the monoamine oxidase structural gene (maoA) and the maoC gene. *J Bacteriol*, **174**, 2485-2492.

Summers, S.A., Whiteman, E.L., Cho, H., Lipfert, L. and Birnbaum, M.J. (1999) Differentiation-dependent suppression of platelet-derived growth factor signaling in cultured adipocytes. *J Biol Chem*, **274**, 23858-23867.

Tabor, H. and Tabor, C.W. (1964) Spermidine. Spermine and related amines. *Pharmacol Rev*, **16**, 245-300.

Taha, C. and Klip, A. (1999) The insulin signaling pathway. *J Membr Biol*, **169**, 1-12.

Taha, C., Liu, Z., Jin, J., Al-Hasani, H., Sonenberg, N. and Klip, A. (1999) Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J Biol Chem*, **274**, 33085-33091.

Tamura, S., Brown, T.A., Whipple, J.H., Fujita-Yamaguchi, Y., Dubler, R.E., Cheng, K. and Larner, J. (1984) A novel mechanism for the insulin-like effect of vanadate on glycogen synthase in rat adipocytes. *J Biol Chem*, **259**, 6650-6658.

Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K. and *et al.* (1994) C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3443-3447.

Tanti, J.F., Gremeaux, T., Grillo, S., Calleja, V., Klippel, A., Williams, L.T., Van Obberghen, E. and Le Marchand-Brustel, Y. (1996) Overexpression of a constitutively active form of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to promote Glut 4 translocation in adipocytes. *J Biol Chem*, **271**, 25227-25232.

Tartaglia, L.A. (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem*, **272**, 6093-6096.

Taylor, W.M. and Halperin, M.L. (1979) Stimulation of glucose transport in rat adipocytes by insulin, adenosine, nicotinic acid and hydrogen peroxide. Role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem J*, **178**, 381-389.

Thompson, K.H. (1999) Vanadium and diabetes. *Biofactors*, **10**, 43-51.

Thomson, M.J., Williams, M.G. and Frost, S.C. (1997) Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **272**, 7759-7764.

Tipping, A.J. and McPherson, M.J. (1995) Cloning and molecular analysis of the pea seedling copper amine oxidase. *J Biol Chem*, **270**, 16939-16946.

Tohka, S., Laukkanen, M., Jalkanen, S. and Salmi, M. (2001) Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) functions as a molecular brake during granulocyte rolling and mediates recruitment *in vivo*. *Faseb J*, **15**, 373-382.

Tolman, E.L., Barris, E., Burns, M., Pansini, A. and Partridge, R. (1979) Effects of vanadium on glucose metabolism *in vitro*. *Life Sci*, **25**, 1159-1164.

Tomas, E., Tsao, T.S., Saha, A.K., Murrey, H.E., Zhang Cc, C., Itani, S.I., Lodish, H.F. and Ruderman, N.B. (2002) Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16309-16313.

Tonks, N.K., Diltz, C.D. and Fischer, E.H. (1988) Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, **263**, 6731-6737.

Tracey, A.S. and Gresser, M.J. (1986) Interaction of vanadate with phenol and tyrosine: implications for the effects of vanadate on systems regulated by tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 609-613.

Trackman, P.C., Pratt, A.M., Wolanski, A., Tang, S.S., Offner, G.D., Troxler, R.F. and Kagan, H.M. (1990) Cloning of rat aorta lysyl oxidase cDNA: complete codons and predicted amino acid sequence. *Biochemistry*, **29**, 4863-4870.

Troiano, R.P. and Flegal, K.M. (1999) Overweight prevalence among youth in the United States: why so many different numbers? *Int J Obes Relat Metab Disord*, **23 Suppl 2**, S22-27.

Tsiani, E., Bogdanovic, E., Sorisky, A., Nagy, L. and Fantus, I.G. (1998) Tyrosine phosphatase inhibitors, vanadate and pervanadate, stimulate glucose transport and GLUT translocation in muscle cells by a mechanism independent of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C. *Diabetes*, **47**, 1676-1686.

Tsuura, Y., Ishida, H., Okamoto, Y., Kato, S., Sakamoto, K., Horie, M., Ikeda, H., Okada, Y. and Seino, Y. (1993) Glucose sensitivity of ATP-sensitive K+ channels is impaired in beta-cells of the GK rat. A new genetic model of NIDDM. *Diabetes*, **42**, 1446-1453.

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.

Venkatesan, N., Avidan, A. and Davidson, M.B. (1991) Antidiabetic action of vanadyl in rats independent of *in vivo* insulin-receptor kinase activity. *Diabetes*, **40**, 492-498.

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.

Vinals, F., Ferre, J., Fandos, C., Santalucia, T., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A. (1997) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulates GLUT4 and GLUT1 glucose transporter expression and stimulates transcriptional activity of the GLUT1 promoter in muscle cells. *Endocrinology*, **138**, 2521-2529.

Visentin, V., Prevot, D., Marti, L. and Carpene, C. (2003) Inhibition of rat fat cell lipolysis by monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates. *Eur J Pharmacol*, **466**, 235-243.

Walker, K.S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P. and Alessi, D.R. (1998) Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin *in vivo* and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 *in vitro*: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem J*, **331 (Pt 1)**, 299-308.

Wallberg-Henriksson, H. and Holloszy, J.O. (1985) Activation of glucose transport in diabetic muscle: responses to contraction and insulin. *Am J Physiol*, **249**, C233-237.

Wang, S.X., Nakamura, N., Mure, M., Klinman, J.P. and Sanders-Loehr, J. (1997) Characterization of the native lysine tyrosylquinone cofactor in lysyl oxidase by Raman spectroscopy. *J Biol Chem*, **272**, 28841-28844.

Wang, X., Pietrangeli, P., Mateescu, M.A. and Mondovi, B. (1996) Extended substrate specificity of serum amine oxidase: possible involvement in protein posttranslational modification. *Biochem Biophys Res Commun*, **223**, 91-97.

Wang, Y., Han, J., Zang, Y. and Guo, W. (2002) Effects of vanadate on leptin production from isolated rat adipocytes. *Biol Trace Elem Res*, **85**, 171-182.

Way, J.M., Gorgun, C.Z., Tong, Q., Uysal, K.T., Brown, K.K., Harrington, W.W., Oliver, W.R., Jr., Willson, T.M., Kliewer, 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.

Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R.E. and Tataranni, P.A. (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 1930-1935.

Whitesell, R.R. and Gliemann, J. (1979) Kinetic parameters of transport of 3-O-methylglucose and glucose in adipocytes. *J Biol Chem*, **254**, 5276-5283.

Widjaja, A., Stratton, I.M., Horn, R., Holman, R.R., Turner, R. and Brabant, G. (1997) UKPDS 20: plasma leptin, obesity, and plasma insulin in type 2 diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 654-657.

Wilce, M.C., Dooley, D.M., Freeman, H.C., Guss, J.M., Matsunami, H., McIntire, W.S., Ruggiero, C.E., Tanizawa, K. and Yamaguchi, H. (1997) Crystal structures of the copper-containing amine oxidase from Arthrobacter globiformis in the holo and apo forms: implications for the biogenesis of topaquinone. *Biochemistry*, **36**, 16116-16133.

Wilmot, C.M., Hajdu, J., McPherson, M.J., Knowles, P.F. and Phillips, S.E. (1999) Visualization of dioxygen bound to copper during enzyme catalysis. *Science*, **286**, 1724-1728.

Wilmot, C.M., Murray, J.M., Alton, G., Parsons, M.R., Convery, M.A., Blakeley, V., Corner, A.S., Palcic, M.M., Knowles, P.F., McPherson, M.J. and Phillips, S.E. (1997) Catalytic mechanism of the quinoenzyme amine oxidase from Escherichia coli: exploring the reductive half-reaction. *Biochemistry*, **36**, 1608-1620.

Wu, L., Mateescu, M.A., Wang, X.T., Mondovi, B. and Wang, R. (1996) Modulation of K+

channel currents by serum amineoxidase in neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, **220**, 47-52.

Wu, S.M., Patel, D.D. and Pizzo, S.V. (1998) Oxidized alpha2-macroglobulin (alpha2M) differentially regulates receptor binding by cytokines/growth factors: implications for tissue injury and repair mechanisms in inflammation. *J Immunol*, **161**, 4356-4365.

Yale, J.F., Lachance, D., Bevan, A.P., Vigeant, C., Shaver, A. and Posner, B.I. (1995) Hypoglycemic effects of peroxovanadium compounds in Sprague-Dawley and diabetic BB rats. *Diabetes*, **44**, 1274-1279.

Yamada, H., Adachi, O., Kumagai, H. and Ogata, K. (1965) Crystalline amine oxidase of Aspergillus niger. *Mem Res Inst for Food Sci*, **26**, 21-23.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M.L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P. and Kadowaki, T. (2001a) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*, **7**, 941-946.

Yamauchi, T., Waki, H., Kamon, J., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Miki, H., Kubota, N., Terauchi, Y., Tsuchida, A., Tsuboyama-Kasaoka, N., Yamauchi, N., Ide, T., Hori, W., Kato, S., Fukayama, M., Akanuma, Y., Ezaki, O., Itai, A., Nagai, R., Kimura, S., Tobe, K., Kagechika, H., Shudo, K. and Kadowaki, T. (2001b) Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest*, **108**, 1001-1013.

Yang, J. and Holman, G.D. (1993) Comparison of GLUT4 and GLUT1 subcellular trafficking in basal and insulin-stimulated 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, **268**, 4600-4603.

Yoon, S.O., Park, S.J., Yoon, S.Y., Yun, C.H. and Chung, A.S. (2002) Sustained production of H(2)O(2) activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway. *J Biol Chem*, **277**, 30271-30282.

Yu, P.H. (1998) Deamination of methylamine and angiopathy; toxicity of formaldehyde, oxidative stress and relevance to protein glycoxidation in diabetes. *J Neural Transm Suppl*, **52**, 201-216.

Yu, P.H. (2001) Involvement of cerebrovascular semicarbazide-sensitive amine oxidase in the pathogenesis of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Med Hypotheses*, **57**, 175-179.

Yu, P.H. and Deng, Y.L. (1998) Endogenous formaldehyde as a potential factor of vulnerability of atherosclerosis: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase- mediated methylamine turnover. *Atherosclerosis*, **140**, 357-363.

Yu, P.H., Lai, C.T. and Zuo, D.M. (1997) Formation of formaldehyde from adrenaline *in vivo*; a potential risk factor for stress-related angiopathy. *Neurochem Res*, **22**, 615-620.

Yu, P.H., Wang, M., Deng, Y.L., Fan, H. and Shira-Bock, L. (2002) Involvement of

semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in atherogenesis in KKAy diabetic mice fed with high cholesterol diet. *Diabetologia*, **45**, 1255-1262.

Yu, P.H. and Zuo, D.M. (1993) Oxidative deamination of methylamine by semicarbazide-sensitive amine oxidase leads to cytotoxic damage in endothelial cells. Possible consequences for diabetes. *Diabetes*, **42**, 594-603.

Yu, P.H. and Zuo, D.M. (1996) Formaldehyde produced endogenously via deamination of methylamine. A potential risk factor for initiation of endothelial injury. *Atherosclerosis*, **120**, 189-197.

Yu, P.H. and Zuo, D.M. (1997) Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: implications for advanced glycation and diabetic complications. *Diabetologia*, **40**, 1243-1250.

Yu, Z.W., Buren, J., Enerback, S., Nilsson, E., Samuelsson, L. and Eriksson, J.W. (2001) Insulin can enhance GLUT4 gene expression in 3T3-F442A cells and this effect is mimicked by vanadate but counteracted by cAMP and high glucose--potential implications for insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*, **1535**, 174-185.

Zabolotny, J.M., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Kim, J.K., Pani, M.A., Boss, O., Klaman, L.D., Kamatkar, S., Shulman, G.I., Kahn, B.B. and Neel, B.G. (2001) Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5187-5192.

Zhang, H.H., Kumar, S., Barnett, A.H. and Eggo, M.C. (2000) Tumour necrosis factor-alpha exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. *Mol Cell Endocrinol*, **159**, 79-88.

Zhang, X., Fuller, J.H. and McIntire, W.S. (1993) Cloning, sequencing, expression, and regulation of the structural gene for the copper/topa quinone-containing methylamine oxidase from Arthrobacter strain P1, a gram-positive facultative methylotroph. *J Bacteriol*, **175**, 5617-5627.

Zhang, X., Kim, J. and McIntire, W.S. (1995) cDNA sequences of variant forms of human placenta diamine oxidase. *Biochem Genet*, **33**, 261-268.

Zhang, X. and McIntire, W.S. (1996) Cloning and sequencing of a copper-containing, topa quinone-containing monoamine oxidase from human placenta. *Gene*, **179**, 279-286.

Zorzano, A., Wilkinson, W., Kotliar, N., Thoidis, G., Wadzinkski, B.E., Ruoho, A.E. and Pilch, P.F. (1989) Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J Biol Chem*, **264**, 12358-12363.

IX. ENGLISH SUMMARY

INDEX

INDEX 1

NOTE FOR THE READER 311

INTRODUCTION 313

2.2.2. SSAO and adipose tissue: insulin-like effects 313

2.2.2.1. SSAO expression in the adipose cell 313

2.2.2.2. SSAO and glucose transport in adipocytes 314

2.2.2.3. SSAO and adipocyte differentiation 315

AIMS 317

RESULTS 319

1. Effects of the *in vivo* combined administration of benzylamine and vanadate on the plasmatic glucose and insulin concentrations in rats. Further studies in the activated signalling mechanism 319

1.1. Effects of SSAO substrates on glucose transport and GLUT4 translocation 321

1.2. SSAO substrates activate signalling pathways similar to those activated by insulin in the adipose cells 321

1.3. *In vivo* administration of benzylamine and vanadate combination reduces glycemia 321

2. Benzylamine and vanadate effects on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats 323

2.1. Glucose tolerance test in non-diabetic and in streptozotocin-induced (STZ) diabetic rats 325

2.2. Chronic treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with benzylamine and vanadate 326

2.3. Glucose metabolism in the peripheral tissues of streptozotocin-induced diabetic rats after chronic treatment with benzylamine and vanadate 326

3. Effects of benzylamine and vanadate combination on glucose metabolism in Goto-Kakizaki diabetic rats 329

3.1. Glucose tolerance test in Goto-Kakizaki diabetic rats 331

3.2. Chronic treatment of Goto-Kakizaki diabetic rats with benzylamine and vanadate 331

3.3. Glucose metabolism in peripheral tissues after chronic treatment with benzylamine and vanadate 332

3.4. Benzylamine and vanadate effects on muscle metabolism and on adipocytokines expression 335

3.5. Implication of protein tyrosine phosphatase and peroxovanadate production in the benzylamine and vanadate-stimulated pathway 336

4. Adipocytes release a soluble form of SSAO/VAP-1 339
4.1. Adipose cells release the soluble form of SSAO/VAP-1 by a shedding mechanism 341
4.2. SSAO release by adipocytes is a regulated process 342
DISCUSSION 343
1. Signalling mechanism implicated in benzylamine and vanadate action in adipocytes 343
2. Effects of benzylamine and vanadate administration *in vivo* 345
2.1. Effects on glucose metabolism 345
2.2. Effects of chronic treatment with benzylamine and vanadate on peripheral tissues 346
2.2.1. Effects of chronic treatment on adipose tissue 346
2.2.2. Effects of the chronic treatment on skeletal muscle 348
2.2.3. Effects of the chronic treatment on β-cells 350
2.3. SSAO/VAP-1 effects on glucose homeostasis 350
2.3.1. Advantages of *in situ* production of peroxovanadate by SSAO 352
2.3.2. Importance of protein tyrosine phosphatase 355
3. Adipocytes as a source of SSAO/VAP-1 356
CONCLUSIONS 363

NOTE FOR THE READER

This section summarizes the introduction, aims, results, discussion and conclusions of the thesis.

The summary of the introduction refers only to the section on SSAO and adipose tissue and includes figure 22 of the Catalan version.

The results section is divided into four chapters corresponding to the four publications included. The first page of the chapter contains the full reference to the corresponding article; a copy of each article is included in the Catalan version. This is followed by a brief summary of the results, which includes unpublished data. Some of the figures included in the Catalan version are also presented here with the same numbering.

The aims, discussion and conclusions have been translated in full. The discussion section includes the same figures as the Catalan version.

The references quoted in this English summary are listed in the reference section “VIII. Referències” of the Catalan version.

INTRODUCTION

2.2.2. SSAO AND ADIPOSE TISSUE: INSULIN-LIKE EFFECTS

2.2.2.1. SSAO EXPRESSION IN THE ADIPOSE CELL

In 1984 Barran and Callingham described the expression of SSAO in white adipose tissue (Barrand and Callingham, 1984). In rat adipocytes there is high SSAO activity (Raimondi *et al.*, 1991), with 14 x 10^6 copies per cell (Morris *et al.*, 1997). SSAO is not expressed in 3T3-L1 or 3T3-F442A fibroblasts and its expression is induced during adipocyte differentiation (Fontana *et al.*, 2001; Moldes *et al.*, 1999) (Figure 22 A). This observation is consistent with previous observations of an enhancement in SSAO activity in preadipocytes of the vascular stroma in rat adipocyte tissue when they were differentiated *in vitro* (Raimondi *et al.*, 1990). These data indicate that SSAO contributes to the acquisition of the adipocyte phenotype.

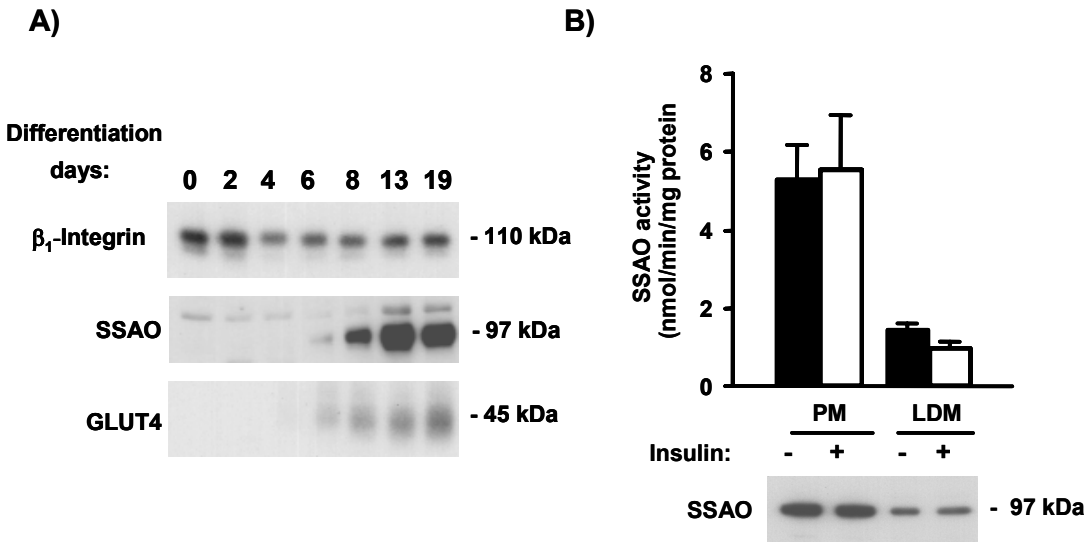


Figure 22. SSAO expression on 3T3-L1 adipocytes membrane during differentiation. A: SSAO and GLUT4 appearance pattern during 3T3-L1 adipocyte differentiation, β1-integrin was used as a load control. **B:** SSAO activity and presence in bovine plasma membrane (PM) and intracellular vesicles (LDM) in the absence or presence of insulin. (Results obtained by Dra. Enrique-Tarancón).

Most of the SSAO expressed in rat adipocytes is located at the plasma membrane (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1997). Thus, the sub-cellular fractionation of 3T3-L1 adipocytes and isolated rat adipocytes demonstrated that SSAO is much more abundant in the plasma membrane (PM) than in light microsomes (LDM) (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1997). Moreover, the tissue distribution is not hormonally regulated, since insulin incubation of adipocytes did not change the amount of protein nor the SSAO activity in the intracellular or the plasmatic membrane (Enrique-Tarancón *et al.*,

1998; Morris *et al.*, 1997) (Figure 22 B). However, its expression and activity are down-regulated by effectors of the cAMP intracellular pathway and by the TNFα cytokine, both involved in adipose tissue development and metabolism (Moldes *et al.*, 1999).

SSAO co-localizes with GLUT4 in adipocytes intracellular vesicles (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1997). However, this co-localization is partial and only between 18 and 24% of the total intracellular SSAO is located in GLUT4-containing vesicles (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998). The intracellular GLUT4 can be located in an endosomal or in an exocytic compartment (Livingstone *et al.*, 1996; Sevilla *et al.*, 1997) and SSAO only co-localizes with GLUT4 in the endosomal compartment (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998) but not in the specific storage compartment.

2.2.2.2. SSAO AND GLUCOSE TRANSPORT IN ADIPOCYTES

SSAO is implicated in the stimulation of glucose transport in isolated rat adipocytes. Benzylamine, an SSAO synthetic substrate, and tyramine, an SSAO and MAO endogenous substrate, stimulate glucose transport in the presence of low and ineffective vanadate concentrations, reaching 70-80% of the maximal insulin effect (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998). Due to the sensitivity of the observed effects to semicarbazide and catalase, it was proposed that amines stimulate the glucose transport via a hydrogen-peroxide dependent mechanism, which may act in synergism with vanadate (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998). Recently, it was described that treatment of 3T3-L1 adipocytes with TNFα not only reduced the SSAO activity and expression but also reduced the insulin and the benzylamine and vanadate-stimulated glucose transport (Mercier *et al.*, 2003).

The stimulation of glucose transport by SSAO substrates was also observed in isolated human adipocytes and in 3T3-L1 and 3T3-F442A adipocytes (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Fontana *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2001) and with substrates other than benzylamine and tyramine, like methylamine, *N*-decylamine, β-phenylethylamine, histamine, *N*-acetylputrescine and tryptamine (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 2001). These data indicate that hydrogen peroxide rather than the aldehyde is responsible for glucose transport stimulation. In 3T3-L1 adipocytes, as in isolated rat adipocytes, glucose transport stimulation required the presence of 0.1 mM vanadate (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998). In isolated human adipocytes and in 3T3-F442A adipocytes, however, stimulate glucose transport can be stimulated in the absence of vanadate (1998; Fontana *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2001).

Regarding the mechanism responsible, the combination of benzylamine and vanadate or tyramine and vanadate increases the amount of GLUT4 present at the plasma membrane,

caused by the translocation from the intracellular compartment, as happens with insulin (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998).

The administration of benzylamine and vanadate *in vivo* also stimulates glucose transport in adipocytes; these studies are described in the results section of this thesis. The effects *in vivo* are not exclusive to benzylamine; tyramine also increases glucose transport in insulin-sensitive tissues in streptozotocin-induced diabetic rats in the absence of vanadate (Morin *et al.*, 2002).

In adipocytes, SSAO substrates mimic other insulin effects, thus anti-lipolytic effects of benzylamine and methylamine in the presence of vanadate have been described in human (Morin *et al.*, 2001) and rat (Visentin *et al.*, 2003) adipocytes, as well as stimulation of adipogenesis (Carpene *et al.*, 2001) and effects in the adipocyte differentiation which will be explained in the following section.

2.2.2.3. SSAO AND ADIPOCYTE DIFFERENTIATION

Another effect of insulin in adipocytes is stimulation of preadipocyte differentiation. To assess the effects of SSAO on adipocyte differentiation, 3T3-F442A adipocytes were incubated in the presence of benzylamine or tyramine for one week; the treatment caused the acquisition of the adipocyte phenotype determined by the appearance of adipose markers, accumulation of triacylglycerol and acquisition of insulin sensitivity (Fontana *et al.*, 2001). Moreover, treatment of 3T3-L1 adipocytes with methylamine also caused differentiation of the cells to adipocytes in a time- and dose-dependent process (Mercier *et al.*, 2001).

All these effects were dependent on SSAO activity and on H_2O_2 production and may be additive to the adipogenic effects of insulin. Thus, it has been suggested that SSAO may be involved in the differentiation and development of adipose tissue (Mercier *et al.*, 2001).

AIMS

White adipose tissue, although it is not a classic tissue for the clearance of exogenous or endogenous amines like the brain, kidney, lung or intestine, has high amino oxidase activity. This activity is due to the presence of two MAO isoforms, MAO A and MAO B (Marti *et al.*, 1998; Pizzinat *et al.*, 1999b), which are mainly present in the mitochondrial fraction, and to SSAO (Raimondi *et al.*, 1992; Raimondi *et al.*, 1991), localized in the plasma membrane. White adipose tissue, the most important tissue in the body for energy storage, regulates whole body glucose homeostasis, and, together with the skeletal and the cardiac muscle, it is an *insulin sensitive* tissue. Such tissues are characterized by the expression of the glucose transporter GLUT4, which is rapidly translocated to the plasma membrane in response to insulin.

The treatment of diabetes *mellitus* is not resolved. Nowadays insulin is the main drug used to treat type 1 diabetes and some cases of type 2 diabetes. Its administration is not straightforward: stable normoglycemia is not easy to achieve, insulin can only be administrated parenterally and it is not effective in all situations, due to the cellular insulin resistance that requires enhancing insulin doses to maintain the therapeutic effects.

In the search of compounds with insulin-like properties, some metals and metal salts have been explored; these include vanadate (Heyliger *et al.*, 1985), tungstate (Goto *et al.*, 1992), selenate (McNeill *et al.*, 1991) and lithium (Bosch *et al.*, 1992). The group in which this thesis was performed is searching for insulin-like or insulin-modulating molecules with therapeutic properties; the insulin-like properties derived from the catalytic activity of SSAO have also been studied.

It should also be mentioned that the research in the SSAO field took a new direction in 1998, shortly before of the beginning of this thesis, when it was demonstrated that the vascular adhesion protein-1 (VAP-1) was identical to SSAO (Bono *et al.*, 1998a). Thus, SSAO/VAP-1 is a protein with a dual function, on one hand it presents amino oxidase activity and on the other, it has adhesion properties implicated in the extravasation of lymphocytes in inflammatory processes.

More recently, adipose tissue, is considered not only an energy storage organ but also an endocrine organ that synthesizes and secretes molecules like leptin, adiponectin or resistin, which control the whole body glucose metabolism (Abel *et al.*, 2001) and relate adipose tissue to the diabetic state (Ahima and Flier, 2000). Glucose transport in adipose tissue and skeletal muscle is the limiting step for glucose utilization, and insulin resistance is observed as a diminution of its capacity to stimulate glucose transport in both tissues. With the aim of assessing the physiological role of the abundant SSAO present in adipose tissue,

previous work by this research group had shown that SSAO substrates in combination with vanadate can stimulate glucose transport due to the translocation of the glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane in isolated rat adipocytes (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998).

At the beginning of this thesis, some aspects of the mechanism by which benzylamine and vanadate act in the adipose tissue were under study. The first objective of this study was to:

1. Continue the studies on the molecular mechanism by which the combination of benzylamine and vanadate acts in the adipose cell and determine the active molecule generated that was responsible for the effects seen after SSAO catalysis in the presence of vanadate.

Once the insulin-like effect of the combination of benzylamine and vanadate in adipose cells was demonstrated, it was necessary to perform *in vivo* studies in different animal models; thus, the following objectives were:

2. Study the acute and chronic effects of benzylamine and vanadate administration in non-diabetic animals and in animal models of type 1 and type 2 diabetes.

3. Study the effect of chronic treatment on adipose tissue and skeletal muscle metabolism and on pancreatic islet activity.

Given the importance of adipose tissue in the pathology of diabetes (Ahima and Flier, 2000), the high SSAO activity present in this tissue (Raimondi *et al.*, 1990) and the fact that circulating SSAO activity is enhanced in diabetes *mellitus* (Nilsson *et al.*, 1968), another objective of this thesis was to:

4. Analyze the adipose tissue involvement in the release of the soluble form of SSAO/VAP-1.

RESULTS

1. EFFECTS OF THE *IN VIVO* COMBINED ADMINISTRATION OF BENZYLAMINE AND VANADATE ON THE PLASMATIC GLUCOSE AND INSULIN CONCENTRATIONS IN RATS. FURTHER STUDIES IN THE ACTIVATED SIGNALLING MECHANISM

The results of this section are published in Article **1**:

Substrates of semicarbazide-sensitive amine oxidase co-operate with vanadate to stimulate tyrosine phosphorylation of insulin-receptor-substrate proteins, phosphoinositide 3-kinase activity and GLUT4 translocation in adipose cells

Biochemical Journal 350:171-180, 2000

Gemma Enrique-Tarancón, Isabelle Castan, Nathalie Morin, Luc Marti, **Anna Abella**, Marta Camps, Roser Casamitjana, Manuel Palacín, Xavier Testar, Eva Degerman, Christian Carpéné and Antonio Zorzano

Contribution:

- *In vivo* administration of the combination of benzylamine and vanadate and glucose and insulin determination in plasma.

- Additional studies of protein kinase B activity (PKB).

1.1. EFFECTS OF SSAO SUBSTRATES ON GLUCOSE TRANSPORT AND GLUT4 TRANSLOCATION

The conclusions of this study by Dra. Gemma Enrique-Tarancón are the followings:

1. Benzylamine and vanadate stimulation of glucose transport in isolated rat adipocytes is a consequence of an enhancement of GLUT4 at the plasma membrane (Figure 1, Article 1).
2. Substrates other than benzylamine can stimulate glucose transport in combination with vanadate (Table 1, Article 1).
3. The glucose transport stimulating effects can also be seen in other adipocyte models such as 3T3-L1 cultured adipocytes (Table 2, Article 1).

1.2. SSAO SUBSTRATES ACTIVATE SIGNALLING PATHWAYS SIMILAR TO THOSE ACTIVATED BY INSULIN IN THE ADIPOSE CELLS

Benzylamine and vanadate only caused a modest phosphorylation of insulin receptor (15% of maximal insulin phosphorylation) (Figure 3, Article 1). After benzylamine and vanadate incubation the insulin receptor substrates IRS-1 and IRS-3 were phosphorylated and phosphoinositide 3-kinase protein (PI3K) was activated (Figure 4, Article 1).

Following the insulin-stimulated pathway another kinase implicated is protein kinase B (PKB). We assayed PKB activity and phosphorylation in the presence of the combination of benzylamine and vanadate. After benzylamine and vanadate incubation there was a 50% of the maximal insulin activation of PKB α and γ activity in adipocytes (Figure 1 A). Serine 473 and threonine 308, the two aminoacids that should be phosphorylated for the activation of PKB, are phosphorylated after benzylamine and vanadate incubation (Figure 1 B).

1.3. *IN VIVO* ADMINISTRATION OF BENZYLAMINE AND VANADATE COMBINATION REDUCES GLYCEMIA

To test whether benzylamine and vanadate affect glycemia *in vivo*, various doses of their combination were administrated to Wistar rats. Thirty minutes after administration, plasma was obtained from the animals and glycemia and insulinemia were measured. 7 μmol/kg body weight of benzylamine in combination with 20 μmol/kg body weight vanadate caused a 16% reduction in the circulating levels of glucose; no changes in the circulating insulin levels were observed. The combination of benzylamine with 10 μmol/kg vanadate or

the vanadate or benzylamine by themselves had no effect on glycemia or insulinemia (Table 5, Article 1).

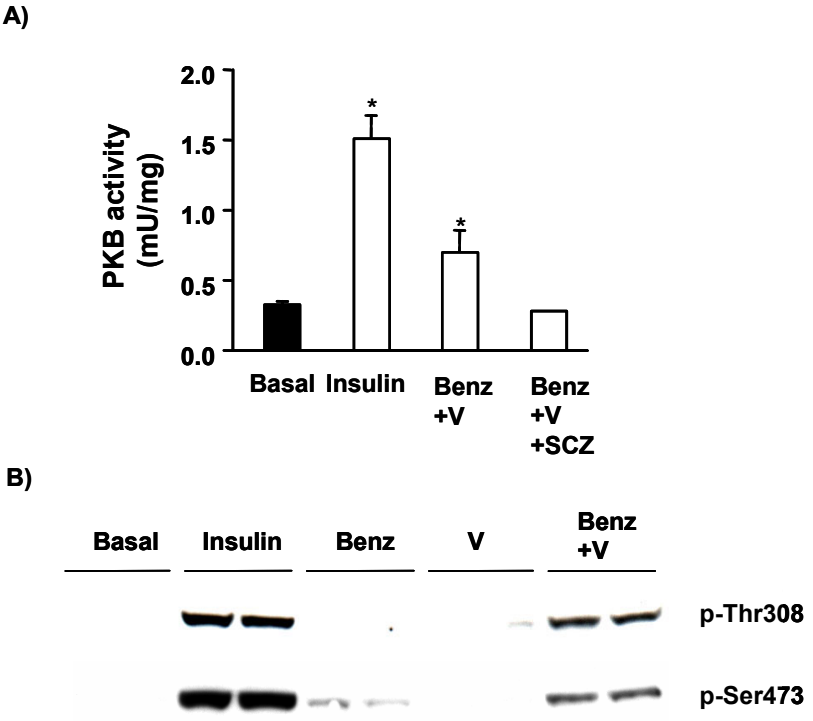


Figure 1. PKB activity in the presence of benzylamine and vanadate. Rat isolated adipocytes were incubated in basal conditions, in the presence of 100 μM insulin for 5 minutes or in the presence of 100 μM benzylamine (Benz), 100 μM vanadate (V) or both (Benz + V) for 30 minutes. Some adipocytes were also incubated with 1 mM semicarbazide (SCZ) 15 minutes before benzylamine and vanadate addition (Benz + V + SCZ). **A.** PKB α+γ activity in the homogenates. **B:** Western blot assay. A representative diagram is shown. The results were obtained with the collaboration of Dr. Jose Miguel Lizcano.

2. BENZYLAMINE AND VANADATE EFFECTS ON GLUCOSE METABOLISM IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

The results of this section are published in **Article 2**:

Combined Treatment With Benzylamine and Low Dosages of Vanadate Enhances Glucose Tolerance and Reduces Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Diabetes, 50:2061-206, 2001

Luc Marti*, **Anna Abella***, Christian Carpéné, Manuel Palacín, Xavier Testar and Antonio Zorzano

* Both first authors contributed equally to the work.

The aim of this study was to determine whether benzylamine and vanadate have insulin-like effects *in vivo*. Thus, the acute and chronic administration of the drugs was assayed in non-diabetic and in streptozotocin-induced diabetic rats, a model of type 1 diabetes *mellitus*.

2.1. GLUCOSE TOLERANCE TEST IN NON-DIABETIC AND IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED (STZ) DIABETIC RATS

In vivo administration of 7 μmol/kg body weight benzylamine and 20 μmol/kg body weight vanadate caused and improvement of 35% and 42% in glucose tolerance in Wistar and STZ diabetic rats respectively (Figures 1 and 2, Article 2).

STZ diabetic rats had lower insulin-stimulated glucose transport in adipose tissue (Kasuga *et al.*, 1978; Kobayashi and Olefsky, 1979) (Figure 5), which is an indication of their insulin resistance. Response to the combination of benzylamine and vanadate, however, was equivalent to the glucose transport in non-diabetic rats (Table 2, Article 2 and Figure 5), which is consistent with the observation that adipose tissue in STZ diabetic rats has normal SSAO activity (Conforti *et al.*, 1995).

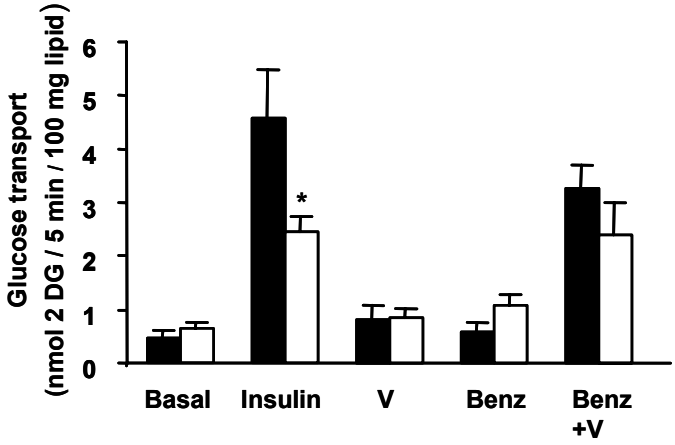


Figure 5. Glucose transport in isolated adipocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. Adipocytes from control (black bars, n = 5) and diabetic rats (open bars, n = 11) were isolated and glucose transport was measured in basal conditions or in the presence of 100 nM insulin, 100 μM vanadate (V), 100 μM benzylamine (Benz) or their combination. The results are mean ± SE.

No changes in the circulating insulin levels or glycosuria on the benzylamine and vanadate treated group were seen after the glucose tolerance test when compared with the control group in either Wistar or STZ-diabetic rats (Table 1 and 3, Article 1).

2.2. CHRONIC TREATMENT OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS WITH BENZYLAMINE AND VANADATE

The chronic administration of 84 μmol/kg/day of benzylamine and 25-50 μmol/kg/day of vanadate reduced the hyperglycaemia of STZ diabetic rats after one week of treatment (Figure 3, Article 2). No modification in food and water consumption, body weight or circulating insulin levels was observed following the treatment (Table 4, Article 2).

The adipose tissue, which was decreased with the establishment of the diabetic state by more that 50% (Table 4, Article 2), was 45% enhanced in animals that had been chronically treated with benzylamine and vanadate (Table 4, Article 2 and Figure 10).

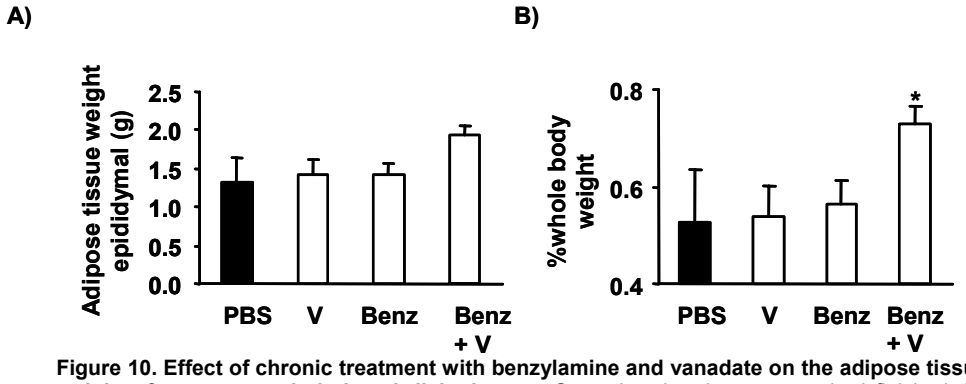


Figure 10. Effect of chronic treatment with benzylamine and vanadate on the adipose tissue weight of streptozotocin-induced diabetic rats. Once the chronic treatment had finished the epididymal adipose tissue was obtained and weighed. The results are represented as absolute adipose tissue weight (**A**) and as percentage of the whole body weight (**B**). The results are mean ± SE of 6-9 observations per group. * $p < 0.05$ *versus* PBS group.

2.3. GLUCOSE METABOLISM IN THE PERIPHERAL TISSUES OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS AFTER CHRONIC TREATMENT WITH BENZYLAMINE AND VANADATE

Chronic treatment with benzylamine and vanadate enhanced basal and insulin-stimulated glucose transport in isolated adipocytes from streptozotocin-induced diabetic rats (Figure 4, Article 2).

In spite of this increase in basal glucose transport, GLUT1, the transporter responsible, was not affected by the chronic treatment (Figure 13). The total amount of GLUT4 transporter, however, was enhanced in the adipocytes isolated from benzylamine and vanadate treated animals (Figure 5, Article 2). This enhancement in the total amount of GLUT4 transporter may be responsible for the increase of the basal glucose transport observed in the adipocytes, and this may contribute to the normalization of glycemia in the animals. Indeed, there is a correlation between the amount of GLUT4 and the basal glucose transport of the adipocytes and an inverse correlation between the amount of GLUT4 in the adipocytes and glycemia at the end of the chronic treatment (Figure 14).

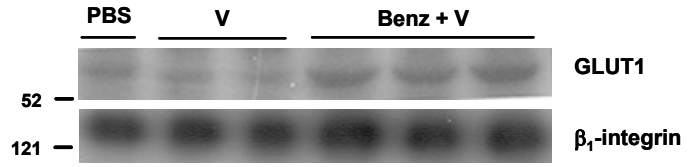


Figure 13. GLUT1 abundance in adipocytes isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. Isolated adipocytes from control (PBS), vanadate (V) or benzylamine and vanadate (Benz + V) treated rats were obtained and the abundance of GLUT1 transporter in total membranes was determined. β1-integrin was used as a load control. A representative autoradiogram is shown.

The enhancement in the basal glucose transport can be due either to the acute effects of benzylamine and vanadate, which increase GLUT4 recruitment to the plasma membrane, or to the presence of a higher amount of GLUT4 in the plasma membrane in non-stimulating conditions. However, the enhancement of glucose transport in isolated adipocytes and the glucose normalization can also be due to a greater sensitization to insulin provoked by benzylamine and vanadate.

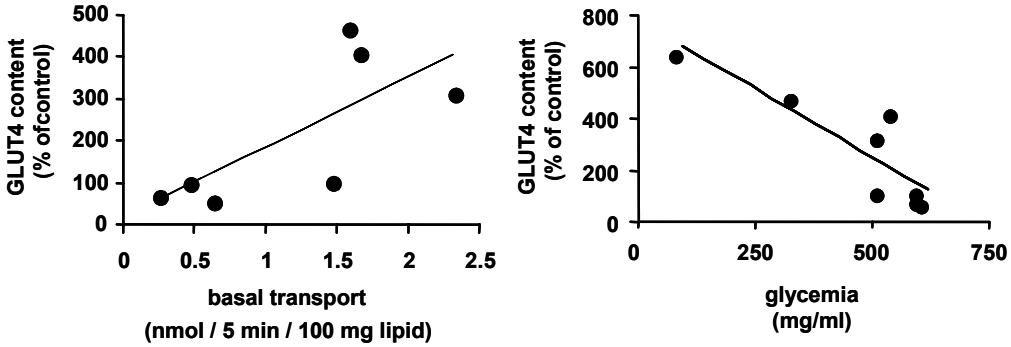


Figure 14. Correlation between GLUT4 abundance in adipocytes and basal glucose transport or glycemia. The amount of GLUT4 was determined in total membranes from adipocytes isolated from adipose tissue of chronically treated diabetic rats. **A:** Correlation between GLUT4 abundance and basal glucose transport ($r = 0.87$, * $p < 0.01$). **B:** Correlation between GLUT4 abundance and the glycemia of the animals at the end of the treatment ($r = 0.73$, * $p < 0.01$).

In the isolated adipocytes, we also studied the capacity of vanadate, benzylamine and the combination of both to stimulate glucose transport. In all cases glucose transport was higher in the benzylamine and vanadate treated group than in the non-treated diabetic group. These results suggest that chronic treatment with benzylamine and vanadate produces sensitization to further stimulus (Figure 4, Article 2 and Figure 15).

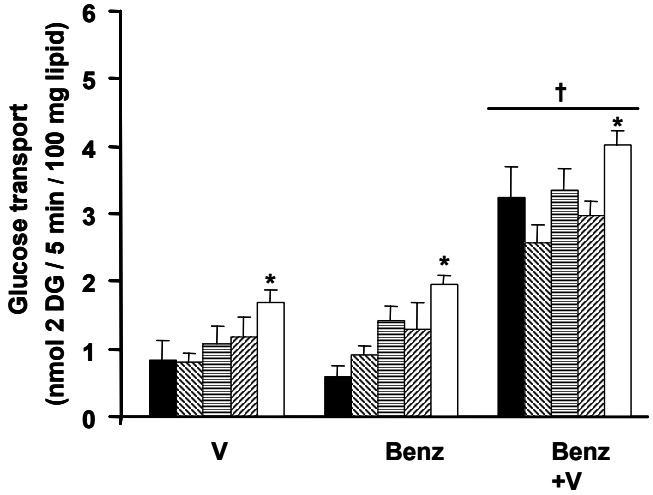


Figure 15. Chronic treatment with benzylamine and vanadate sensitized the adipocytes. Adipocytes were isolated from non-diabetic (□) and diabetic rats treated during two weeks with the vehicle PBS (■), 25 and 50 μmol/kg/day vanadate (▨), 84 μmol/kg/day benzylamine (▤) and the combination of both (▨), glucose transport was performed in the presence of 100 mM vanadate, 100 mM benzylamine or their combination. The results are mean ± SE of 4-5 observations per group. * $p < 0.05$ indicates differences with the PBS group. † $p < 0.05$ indicates differences with the correspondent basal glucose transport.

Skeletal muscle is one of the main tissues that consume glucose during the absorptive state (DeFronzo *et al.*, 1981), no changes on GLUT1 or GLUT4 transporters were observed (Figure 16).

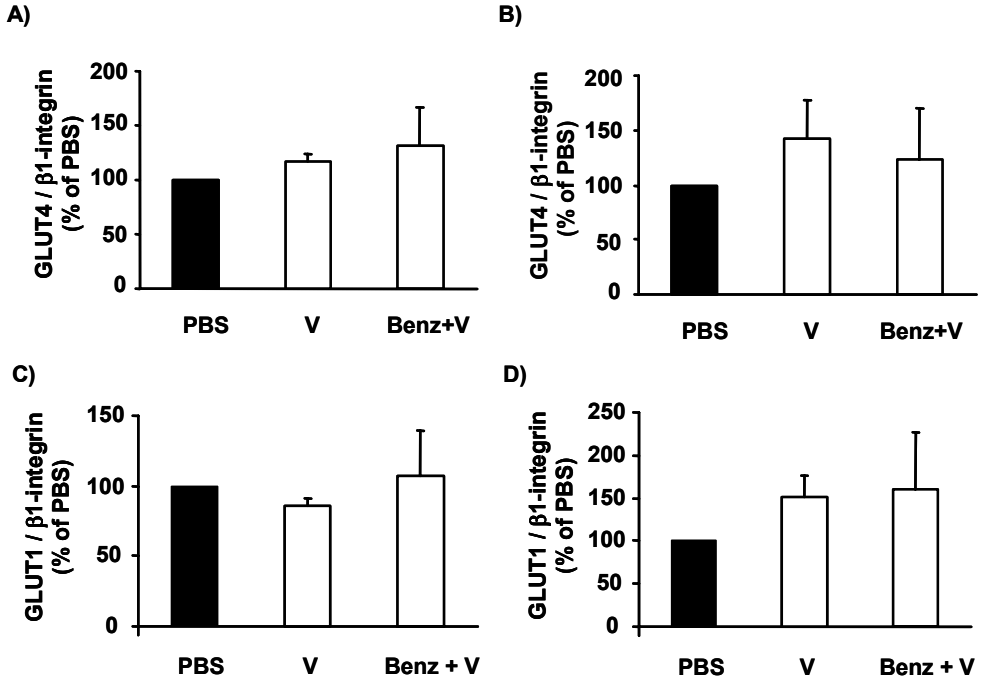


Figure 16. GLUT4 and GLUT1 abundance in total membranes of skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. Membranes of *soleus* and EDL muscles were obtained after two weeks treatment with the vehicle (PBS), vanadate (V) or benzylamine and vanadate (Bens + V). The results are expressed corrected by the load control β1-integrin and referred to the control PBS and are mean ± SE. **A:** GLUT4 abundance in *soleus* muscle (n=3). **B:** GLUT4 abundance in EDL (n=6). **C:** GLUT1 abundance in *soleus* muscle (n=4-6). **D:** GLUT1 abundance in EDL (n=4-6).

3. EFFECTS OF BENZYLAMINE AND VANADATE COMBINATION ON GLUCOSE METABOLISM IN GOTO-KAKIZAKI DIABETIC RATS

The results of this section are published in **Article 3**:

Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase/Vascular Adhesion Protein -1 Activity Exerts an Antidiabetic Action in Goto-Kakizaki Rats.

Diabetes, 52:1004-1013, 2003

Anna Abella*, Luc Marti*, Marta Camps, Marc Claret, J. Fernández-Álvarez, Ramon Gomis, Anna Gumà, Nathalie Viguerie, Christian Carpéné, Manuel Palacín, Xavier Testar and Antonio Zorzano

* Both first authors contributed equally to the work.

Next, the effect of benzylamine and vanadate on glucose metabolism in Goto-Kakizaki diabetic rats, a model of type 2 diabetes, was assayed.

3.1. GLUCOSE TOLERANCE TEST IN GOTO-KAKIZAKI DIABETIC RATS

Acute benzylamine and vanadate administration in Goto-Kakizaki diabetic rats improved glucose tolerance of the animals in a dose-dependent manner (30% or 47% depending whether the vanadate dose was 10 μmol/kg body weight or 20 μmol/kg body weight, together with 7 μmol/kg body weight benzylamine respectively) (Figure 1, Article 3).

The improvement of glucose tolerance was accompanied by an increase of circulating insulin levels (Figure 4 A and B, Article 3). *In vitro* studies on isolated pancreatic islets were performed to determine whether the effects observed *in vivo* were a consequence of the direct stimulation by benzylamine and vanadate on insulin secretion by the pancreatic islet.

SSAO activity (Table 4) and protein (Figure 4 E, Article 3) was detected in pancreatic islets. Benzylamine and vanadate stimulated insulin secretion in pancreatic islets of Goto-Kakizaki diabetic rats incubated with 16.7 mM glucose, but not in islets from Wistar rats (Figure 4 C and D, Article 3). Thus, these data are consistent with the *in vivo* results, where changes in insulin circulating levels were observed in Goto-Kakizaki diabetic rats but not in Wistar rats.

Table 4. SSAO activity on isolated rat adipocyte homogenates and in pancreatic islet homogenates. Data are mean ± SE of 3 observation per group.

	Rat SSAO activity
Adipocytes	2.57 ± 0.45 nmol/min/mg protein
Pancreatic islets	8 ± 0.7 pmol/min/mg protein

3.2. CHRONIC TREATMENT OF GOTO-KAKIZAKI DIABETIC RATS WITH BENZYLAMINE AND VANADATE

Chronic treatment of Goto-Kakizaki diabetic rats with 84 μmol/kg/day benzylamine and 25 μmol/kg/day vanadate produced normalization of the glycemia after one week of treatment (Figure 2, Article 3). No changes in insulin levels were observed (Table 5); thus, Goto-Kakizaki diabetic rats remained hyperinsulinemic.

Table 5. Plasma insulin concentrations of non-diabetic and Goto-Kakizaki diabetic rats before and after chronic treatment. Data are mean ± SE of 4-5 observations per group. * p < 0.05 indicates differences between insulin levels before and after the treatment.

Insulin (ng/ml)

GK	day 0	day 14
PBS	2.35 ± 0.51	3.81 ± 1.00
Benzylamine	3.37 ± 0.96	3.84 ± 0.23
Vanadate	3.86 ± 0.13	1.47 ± 0.18 *
Benzylamine + Vanadate	2.58 ± 0.71	2.11 ± 0.8
Non-diabetic	1.10 ± 0.30	

3.3. GLUCOSE METABOLISM IN PERIPHERAL TISSUES AFTER CHRONIC TREATMENT WITH BENZYLAMINE AND VANADATE

Glucose metabolism in adipose tissue and skeletal muscle was assayed after chronic treatment in Goto-Kakizaki diabetic rats.

Goto-Kakizaki diabetic rats showed only a slight insulin resistance in the adipose tissue, which was only seen at submaximal insulin concentrations (Figure 22 A); this partial insulin resistance can explain the slight hyperglycemia observed in these animals, probably mostly compensated by their hyperinsulinemia.

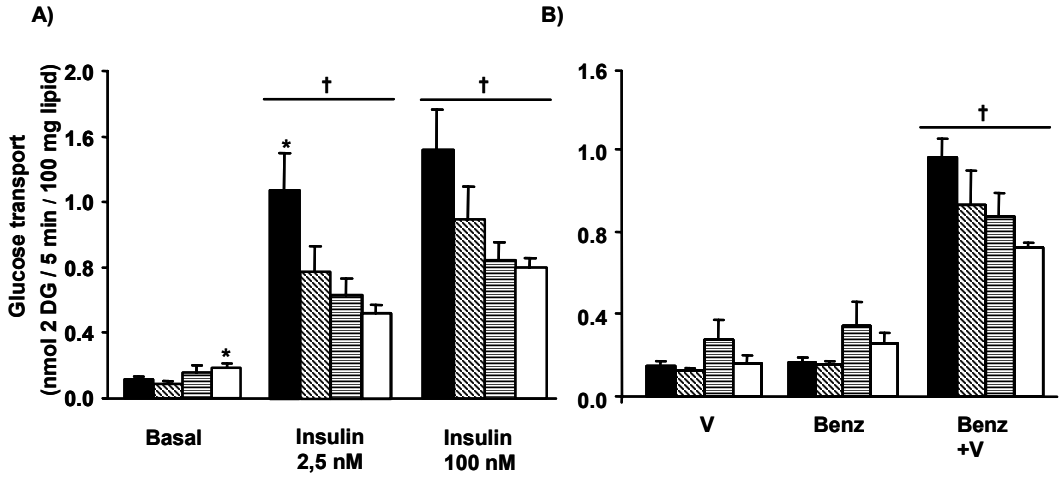


Figure 22. Glucose transport in isolated adipocytes of non-diabetic and Goto-Kakizaki diabetic rats after the chronic treatment. Adipocytes from non-diabetic (■), or diabetic rats treated for two weeks with the vehicle PBS (▨), 25 μmol/kg/day vanadate (▤) or the combination of 84 μmol/kg/day benzylamine and vanadate (□) were isolated and glucose transport was performed. **A:** Transport in basal conditions or in the presence of 100 or 2.5 nM of insulin. **B:** Transport in the presence of 100 μM, vanadate, 100 μM benzylamine or the combination of both. * p < 0.05 indicates differences with the diabetic group that received PBS. † p < 0.05 indicates differences with the basal glucose transport corresponding to each group. Data is mean ± SE of 4-6 observations per group.

As in streptozotocin-induced diabetic rats, benzylamine and vanadate-stimulated glucose transport was similar in Goto-Kakizaki and Wistar rats. Moreover, in Goto-Kakizaki

diabetic rats, benzylamine and vanadate-stimulated transport reached 100% of the maximal insulin stimulation (Figure 22).

The basal glucose transport in Goto-Kakizaki diabetic rats chronically treated with benzylamine and vanadate was greater than in the non-treated controls (Figure 22). Insulin-stimulated glucose transport however, was not modified (Figure 22).

There were no changes in the expression of glucose transporters after the treatment (Figure 23). However, the amount of GLUT4 present at the adipocyte plasma membrane in the basal state was increased (Figure 2 C, Article 3). The increase in the basal glucose transport may be due to the enhancement in the amount of GLUT4 transporter at the plasma membrane; indeed, there is a correlation between these two parameters (Figure 2 C, Article 3).

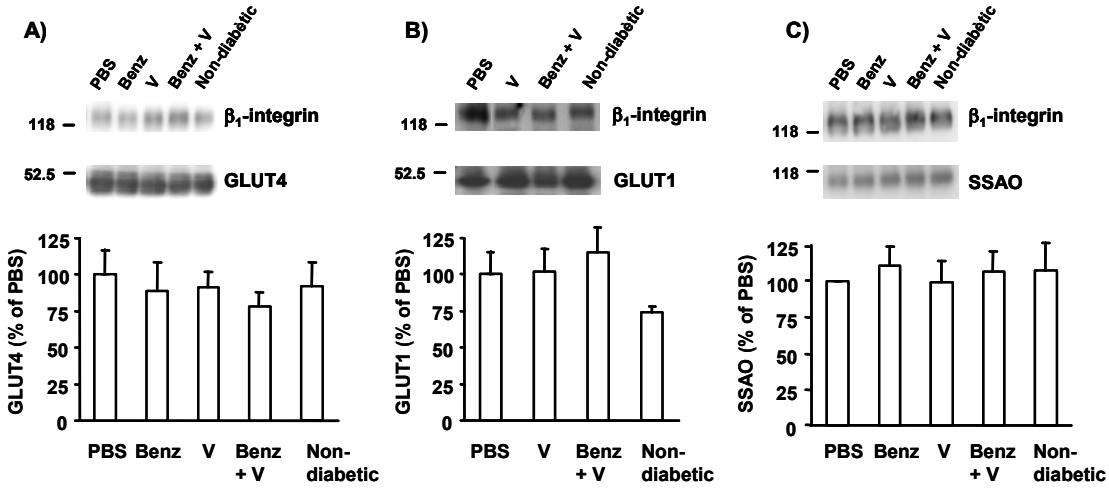


Figure 23. GLUT4 (A), GLUT1 (B) and SSAO (C) abundance in isolated adipocytes from Goto-Kakizaki diabetic rats. Adipocytes were isolated at the end of the chronic treatment with PBS, vanadate, benzylamine or benzylamine and vanadate and the abundance of the proteins was measured in total membranes of these adipocytes. Results are mean ± SE of 5 observations per group. A representative autoradiogram for each protein is shown.

In isolated adipocytes from Goto-Kakizaki diabetic rats, the association between IRS-1 and PI3K increased after benzylamine and vanadate treatment (Figure 24). Low activity of PI3K has been described in these animals in response to insulin (Begum and Ragolia, 1998; Kanoh *et al.*, 2000), so the enhancement observed in basal conditions could be implicated in the enhancement of GLUT4 at the plasma membrane.

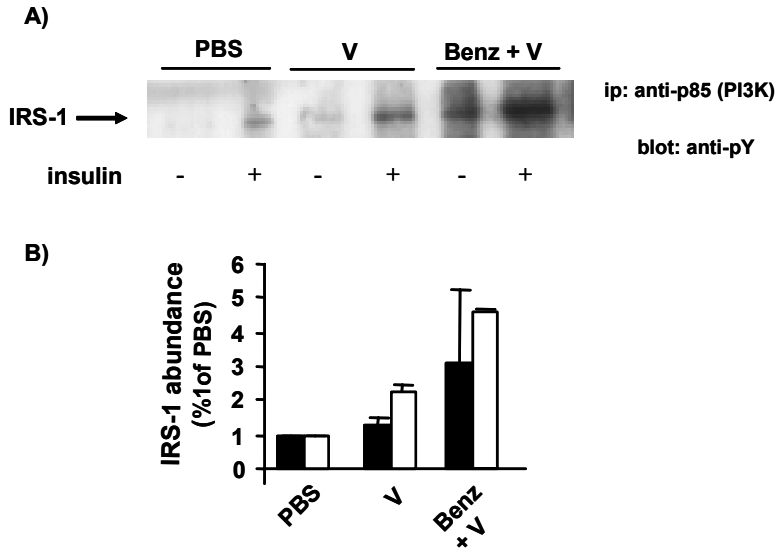


Figure 24. The chronic treatment with benzylamine and vanadate enhances IRS-1 and p85 association in adipose tissue from Goto-Kakizaki diabetic rats. Isolated adipocytes from rats that had received PBS or chronically treated with vanadate or the combination of benzylamine and vanadate were incubated in basal or insulin-stimulated conditions. Immunoprecipitation with a p85, regulatory subunit of PI3K, antibody was performed. **A:** Western blot from the immunoprecipitation revealed with anti-phosphotyrosine antibody. A representative autoradiogram is shown. **B:** Autoradiogram quantification. The results are mean ± SE of 3 observations per group.

In the case of skeletal muscle, no changes in glucose transporter GLUT4 were observed after the chronic treatment (Figure 25), the slight increase seen in GLUT1 expression did not correlate with the basal glucose transport observed. There was an increase in the insulin-stimulated glucose transport in this tissue (Figure 2 D, Article 3). Skeletal muscle of Goto-Kakizaki diabetic rats shows resistance to insulin (Song *et al.*, 1999) (Figure 2 D, Article 3); the treatment with benzylamine and vanadate re-established the insulin sensitivity of the tissue. Thus, in Goto-Kakizaki diabetic rats, the enhanced insulin

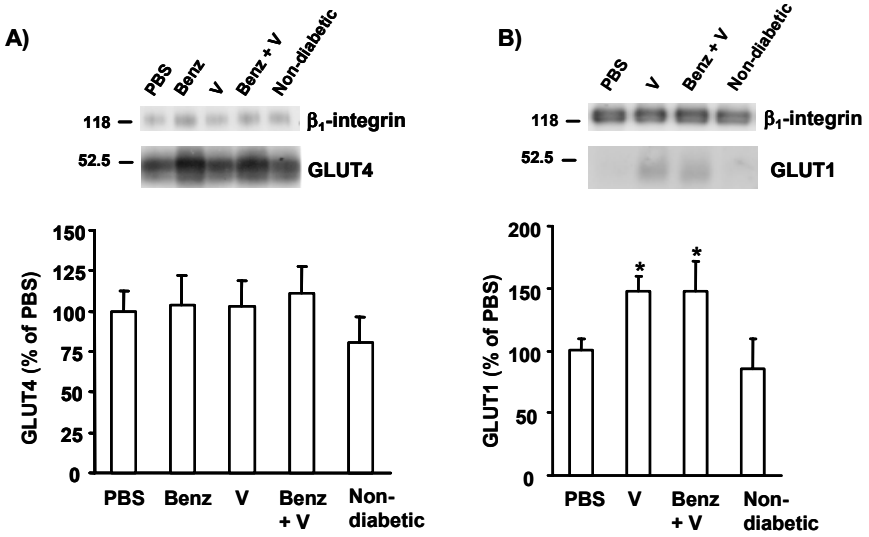


Figure 25. GLUT4 (A) and GLUT1 (B) abundance in *soleus* muscle of Goto-Kakizaki diabetic rats. *Soleus* muscle were isolated from non-diabetic and diabetic animals treated during two weeks with the vehicle PBS, benzylamine, vanadate or their combination and total membranes were prepared. GLUT4 and GLUT1 abundance was assayed by Western blot. Results are mean ± SE of 4-5 observation per group. A representative autoradiogram is shown for each of the proteins.

sensitization of the muscle, together with the enhanced basal glucose transport observed in the adipose tissue, could participate in the normoglycemic effects seen *in vivo*.

3.4. BENZYLAMINE AND VANADATE EFFECTS ON MUSCLE METABOLISM AND ON ADIPOCYTOKINES EXPRESSION

Acute administration of benzylamine and vanadate to Wistar rats stimulated glucose transport in the muscle (Figure 3 A, Article 3). Due to the absence of SSAO activity in skeletal muscle and the absence of direct stimulation of benzylamine and vanadate on muscle glucose transport (Figure 3 B, Article 3), we assayed whether adipose tissue, via the release of an adipocytokine or molecule, affected the muscle.

We analyzed the expression of several adipocytokines in the adipose tissue of Goto-Kakizaki diabetic rats after the chronic treatment. There was no correlation between the adipocytokines expression and the glycemia at the end of the chronic treatment (Figure 28). Changes in the circulating levels of free fatty acids and triacylglycerol were also ruled out (Figure 29).

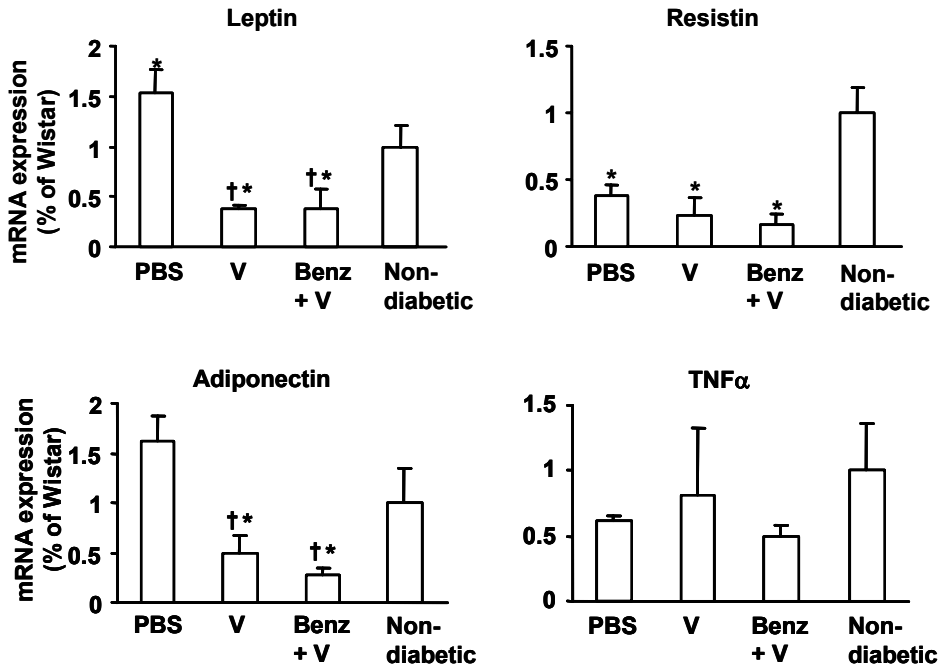


Figure 28. Effect of the chronic treatment on mRNA expression of different adipocytokines in adipose tissue. Levels were assayed by real-time PCR. * $p < 0.05$ compared to the non-diabetic group, † $p < 0.05$ compared to the diabetic PBS group. TNFα: Tumor Necrosis Factor alpha.

Due to the growing importance assigned to adipose tissue in whole glucose homeostasis (Abel *et al.*, 20001) we assayed glucose transport in skeletal muscle in the presence of adipose tissue explants. The incubation of *soleus* muscle strips with benzylamine and vanadate in the presence of adipose tissue explants stimulated glucose transport to 70% of the maximal effect of insulin (Figure 3 B, Article 3). Based on

coincubations with human recombinant SSAO we concluded that the stimulation only required the presence of SSAO activity and not the rest of the adipose cell (Figure 3 C, Article 3). Thus, a rapidly generated molecule may be responsible for the insulin-like effects seen in the muscle.

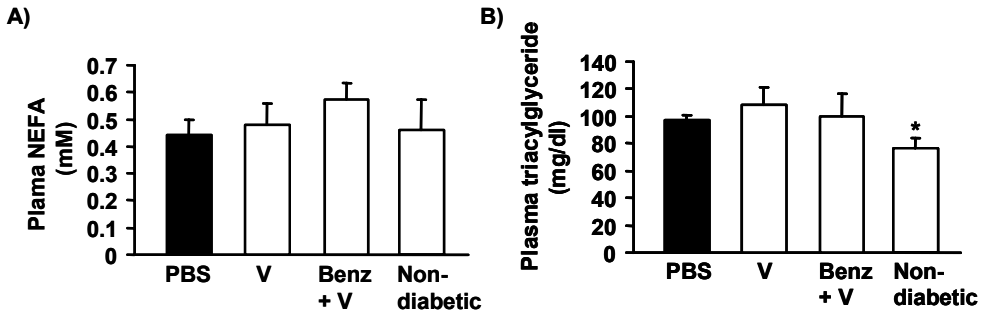


Figure 29. Effect of the chronic treatment on free fatty acid (A) (FFA or NEFA) or triacylglyceride (B) release by the adipose tissue. The circulating levels were determined using a commercial kit in the plasma of non-diabetic and Goto-Kakizaki diabetic rats at the end of the chronic treatment. The results are mean ± SE of 5 observations per group. * $p < 0.05$ compared to the PBS group.

3.5. IMPLICATION OF PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE AND PEROXOVANADATE PRODUCTION IN THE BENZYLAMINE AND VANADATE-STIMULATED PATHWAY

Hydrogen peroxide is necessary for the benzylamine and vanadate-stimulated glucose transport and GLUT4 recruitment to the plasma membrane (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998). Due to this observation and to the insulin-like effects of peroxovanadate (Fantus *et al.*, 1989) we assayed the possible formation of this insulin-like agent by SSAO activity in the presence of vanadate and its implication in the effects observed.

Many lines of evidence suggested that the molecule responsible for the effects of benzylamine and vanadate *in vivo* and *in vitro* is peroxovanadate:

1. The amount of tyrosine phosphorylated proteins is increased in adipose tissue homogenates of streptozotocin-induced diabetic rats treated with benzylamine and vanadate (Figure 31).
2. Incubation of isolated adipocytes with benzylamine and vanadate enhanced protein tyrosine phosphorylation in a similar way to the incubation with peroxovanadate (Figure 5 B, Article 3)
3. Tyrosine phosphatase activity in isolated adipocyte homogenates is reduced in a similar way after incubation with benzylamine and vanadate or peroxovanadate (Figure 5 C, Article 3)
4. The incubation of human recombinant SSAO with benzylamine and vanadate generates mono- and tri-peroxovanadate, as detected by nuclear magnetic resonance (NMR) experiments (Figure 5 A, Article 3).

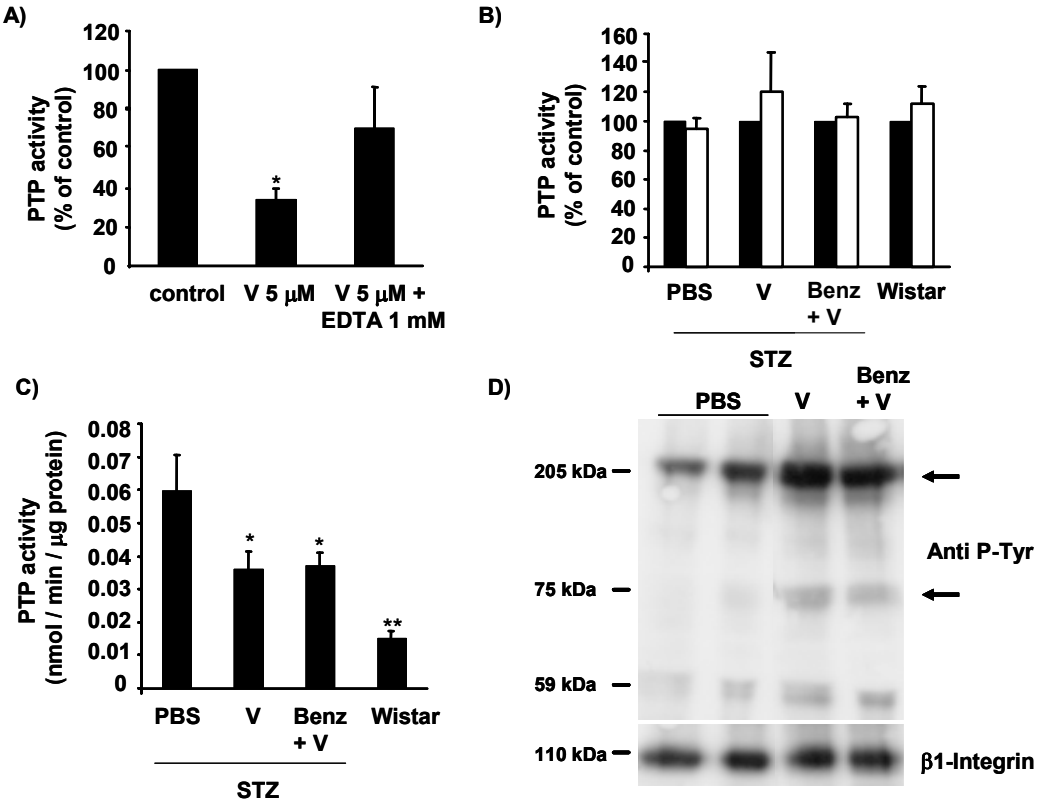


Figure 31. PTP activity and phosphorylation level in adipose tissue homogenates. A: PTP activity of adipose tissue homogenates from Wistar rats was assayed in the presence or absence of 5 μM vanadate and / or 1 mM EDTA. Results are expressed as residual activity compared to control values, n = 3. * p <0.05 compared to control. **B:** PTP activity from adipose tissue homogenates from diabetic (STZ), vanadate treated (V), benzylamine and vanadate treated (Benz + V) and non-diabetic rats (Wistar) was assayed in the absence (black bars) or in the presence (open bars) of 1 mM EDTA. Results are expressed as percentage of control values without EDTA, n = 4-9. **C:** PTP activity in adipose tissue homogenates from diabetic (STZ), vanadate treated (V), benzylamine and vanadate treated (Benz + V) and non-diabetic rats (Wistar). Results are presented as nmol/min/μg of protein, n = 4-18. * p <0.05, ** p <0.01 compared to STZ group. **D:** Phosphorylation level in adipose tissue homogenates from non.treated diabetic rats (PBS) or two weeks treated rats with vanadate (V) or benzylamine and vanadate (Benz + V). 100 μg of protein per well were loaded in a 7% acrylamide gel. Immunobloting was performed with an anti-phophotyrosine antibody. As a load control β1-integrin was used. A representative autoradiogram is shown.

All these studies suggest that benzylamine and vanadate can generate peroxovanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase proteins, in the adipose cell. Tyrosine phosphatase proteins are implicated in the dephosphorylation of proteins that terminate the insulin signalling pathway. Alteration in the activity of these proteins has been implicated in the insulin resistance observed in diabetes and obesity (Ahmad *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 1995; Ahmad and Goldstein, 1995a; Ahmad and Goldstein, 1995b; Zabolotny *et al.*, 2001). After benzylamine and vanadate administration the peroxovanadate generated may inhibit tyrosine phosphatase proteins and diminish the insulin resistance in peripheral tissues

4. ADIPOCYTES RELEASE A SOLUBLE FORM OF SSAO/VAP-1

The results of this section are published in **Article 4**:

Adipocytes release a soluble form of VAP-1/SSAO by a metalloprotease-dependent process and in a regulated manner

Sent to *Diabetes*

Anna Abella, Nathalie Viguerie, Anna Ros, Manuel Palacín, Antonio Zorzano and Luc Marti

4.1. ADIPOSE CELLS RELEASE THE SOLUBLE FORM OF SSAO/VAP-1 BY A SHEDDING MECHANISM

Many lines of evidence suggest that adipocytes release an active form of SSAO protein:

1. In the medium of 3T3-L1 adipocytes there is SSAO protein and activity, which is enhanced after 1, 24 or 48 hours of incubation (Figures 1 A and 2, Article 4). The amount of protein released to the culture medium is 0.63% of the total present in the adipocyte membrane.
2. In human adipose tissue explants there is an active SSAO protein (Figure 1 C, Article 4 and Figure 33).
3. The ablation of epididymal and perirenal adipose tissue in Wistar rats led to a 30% reduction in the circulating levels of SSAO (Figure 7, Article 4).

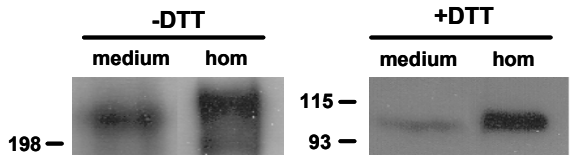


Figure 33. SSAO protein in human adipocyte explants. Human adipocyte explants were incubated for 48 hours in a serum-free medium. Western blot analysis of SSAO in adipose tissue homogenates (hom) in the absence (-DTT) or presence of 2 mM DTT. TK 10-79 antibody was used. A representative autoradiogram is shown.

Other lines of evidence suggest that the protein released by the adipocytes is the result of a shedding process of the membrane form:

1. The 2 kDa reduction in the molecular weight is consistent with the loss of the transmembrane and cytoplasmatic domains of the membrane protein (Smith *et al.*, 1998).
2. The km values for benzylamine oxidation of the soluble and membrane proteins are very similar (Figure 1 B, Article 4)
3. The soluble and membrane proteins present the same amount of glycosylations and sialic acid residues (Figure 2 B, Article 4).
4. Metalloprotease inhibitor batimastat reduced SSAO activity and protein in the culture medium of 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue explants (Figure 3, Article 4).

4.2. SSAO RELEASE BY ADIPOCYTES IS A REGULATED PROCESS

SSAO release is increased by factors implicated in insulin resistance, such as TNFα and cAMP (Figures 4 and 5, Article 4), which can explain the enhancement of circulating SSAO observed in the diabetic state.

The absence of SSAO activity due to the presence of semicarbazide enhances the SSAO release by the adipocytes (Figure 6, Article 4). This result was observed in the absence of SSAO activity in both the medium and the cell membrane, suggesting that the presence of amino oxidase activity is necessary for a correct SSAO release pattern.

Interestingly, there is a correlation between the amount of SSAO and the amino oxidase activity in the medium irrespective of the treatment (Figure 39); these data suggest that the amino oxidase activity observed in the medium corresponds to SSAO protein.

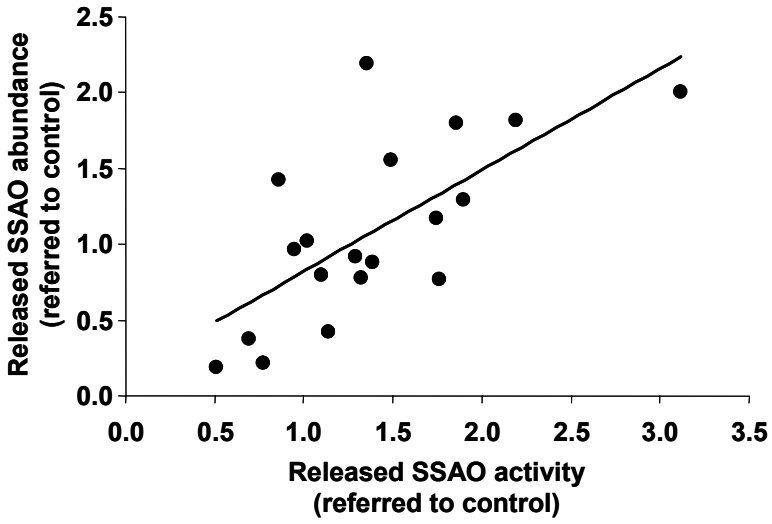


Figure 39. Correlation between SSAO abundance and amino oxidase activity in the medium of 3T3-L1 adipocytes. A correlation between SSAO abundance in the medium detected by Western blot and amino oxidase activity is observed. The results are referred to the control; the control is the medium of the non-treated cells for each set of experiments. The correlation is significant r = 0.69 and $p < 0.001$

DISCUSSION

1. SIGNALLING MECHANISM IMPLICATED IN BENZYLAMINE AND VANADATE ACTION IN ADIPOCYTES

A critical point in the stimulating mechanism of GLUT4 translocation to the plasma membrane in adipocytes was the nature of the active molecule generated by SSAO catalysis in the presence of vanadate. In the stimulated pathway the insulin receptor was not highly activated, which suggested that the beginning of this pathway was different from the insulin-stimulated pathway. Benzylamine and vanadate stimulation was characterised by an enhancement in protein tyrosine phosphorylation level. The study of the protein tyrosine phosphatase activity in the presence of benzylamine and vanadate suggested that the activation begins with the inhibition of proteins tyrosine phosphatase rather than with the activation of a protein tyrosine kinase. Many lines of evidence suggest that peroxovanadate is the messenger generated after the benzylamine oxidation by SSAO in the presence of vanadate:

1. In streptozotocin-induced diabetic rats adipose tissue homogenates treated chronically with benzylamine and vanadate show higher tyrosine phosphorylation levels and lower phosphatase activity (Figure 31 of the results).
2. Incubation of isolated rat adipocytes with benzylamine and vanadate enhanced protein tyrosine phosphorylation in a similar way than incubation with peroxovanadate (Figure 5 B, Article 3).
3. Protein tyrosine phosphatase activity in adipocyte homogenates incubated with benzylamine and vanadate or peroxovanadate was decreased in a similar way (Figure 5 C, Article 3).
4. Incubation of human recombinant SSAO with benzylamine and vanadate generated mono- and tri-peroxovanadate, which were detected by nuclear magnetic resonance (NMR) (Figure 5 A, Article 3).

In insulin-stimulated glucose transport pathway there is an equilibrium between tyrosine kinase and tyrosine phosphatase proteins; at the beginning there is an activation of kinase proteins which is followed by activation of tyrosine phosphatase proteins that end up with the signal (Goldstein *et al.*, 2000). In the case of SSAO substrates and vanadate, the data indicate that peroxovanadate, an irreversible inhibitor of protein tyrosine phosphatase, generated in the presence of SSAO activity may enhance the tyrosine phosphorylation level of the adipocyte. In this regard, though only a partial induction of the insulin receptor kinase activity was observed, there was a potent activation of the insulin receptor substrates IRS-1 and IRS-3. IRS-3 is implicated in the insulin-stimulated pathway in the absence of IRS-1 (Kaburagi *et al.*, 1997), and is the main IRS phosphorylated in the SSAO activated pathway.

Phosphorylation of the insulin receptor substrates, or the absence of dephosphorylation, provokes the activation of PI3K (phosphoinositide 3-kinase) via the interaction of p85, its regulation domain, with the IRS, and the subsequent activation of PKB (protein kinase B) (Article 1). We propose that the activation of these proteins by the combination of SSAO substrates and vanadate causes the recruitment of GLUT4 to the plasma membrane and the stimulation of the glucose transport in adipocytes (Figure 1).

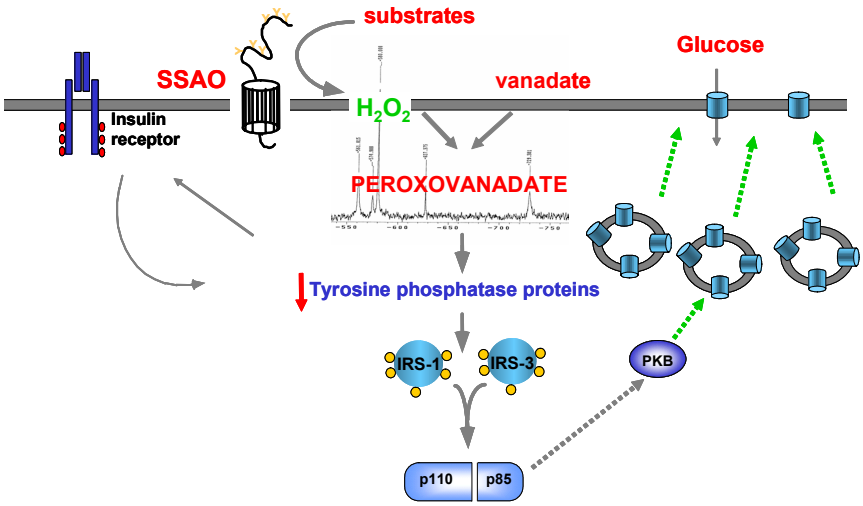


Figure 1. Stimulation of glucose transport by SSAO substrates.

The finding that the GLUT4 translocation to the plasma membrane and the glucose stimulated transport was produced by benzylamine and vanadate via the production of peroxovanadate was consistent with previous observations that show that: i) hydrogen peroxide was crucial for the effects observed and catalase abolished these effects (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998); ii) peroxovanadate is a potent insulin-like agent (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Posner *et al.*, 1998).

There are also reasons why peroxovanadate should not be considered the only agent responsible for the effects observed: i) peroxovanadate, in contrast to vanadate (Green, 1986; Mooney *et al.*, 1989), highly induces the insulin receptor kinase activity in rat adipocytes (Kadota *et al.*, 1987; Shisheva and Shechter, 1993a); whereas the combination of benzylamine and vanadate only caused modest stimulation (Figure 3, Article 1); ii) insulin and peroxovanadate have additive effects in the stimulation of glucose transport in isolated rat adipocytes (Shisheva and Shechter, 1993a), which was not observed in our experiments. However, the additive effects were observed at peroxovanadate concentrations greater that 20 μM. In our case, due to the *in situ* production of peroxovanadate by SSAO activity, the absence of additivity can be explained because this peroxovanadate concentration is not reached. Indeed, in isolated adipocytes it was described that 1 mM tyramine can generate 40 μM H_2O_2 (Marti *et al.*, 1998). In our experiments we used 100 μM benzylamine, which is unlikely to produce more than 4 μM H_2O_2 after 45 minutes of incubation.

2. EFFECTS OF BENZYLAMINE AND VANADATE ADMINISTRATION *IN VIVO*

2.1. EFFECTS ON GLUCOSE METABOLISM

Table 1 summarizes the effects of acute and chronic treatment with benzylamine and vanadate in streptozotocin-induced diabetic rats (type 1 diabetes) and Goto-Kakizaki diabetic rats (type 2 diabetes): the differences between the two models are highlighted. All these effects were observed only in the presence of both drugs.

Table 1. Acute and chronic effects of benzylamine and vanadate in two animal models of diabetes.

	STZ (type 1 diabetes)	GK (type 2 diabetes)
Glucose Tolerance improvement	yes (42%)	yes (47%)
Insulin secretion	**no effect**	**enhanced**
Glycemia normalization	yes	yes
Basal glucose transport in adipocytes	enhanced	enhanced
Insulin-stimulated glucose transport in adipocytes	**enhanced**	**no effect**
GLUT4 abundance in adipocytes	**enhanced**	**no effect**
GLUT4 abundance in the adipocytes plasma membrane	-	enhanced
Basal glucose transport in muscle	-	no effect
Insulin-stimulated glucose transport in muscle	-	enhanced
GLUT4 abundance in muscle	no effect	no effect

The glucose tolerance was enhanced by 42% in streptozotocin-induced diabetic rats and by 47% in Goto-Kakizaki diabetic rats (Figure 2, Article 2 and Figure 1 B and 1C, Article 3). In the latter model the improvement in the glucose tolerance was associated with recovery of the first insulin secretion phase (Figure 4, Article 3), while in the former no changes in insulin secretion were observed (Table 3, Article 2), which can be explain by the destruction of the pancreatic β cells during the development of the diabetic state.

The insulin secretion results indicate that the effects of benzylamine and vanadate administrated acutely on the streptozotocin-induced diabetic rats are insulin-like; while in the Goto-Kakizaki diabetic rats there are insulin-like effects and also insulin-sensitization of the peripheral tissues to insulin or due to the enhancement of insulin secretion.

In the chronic treatments the effects appeared initially one week after the administration of benzylamine and vanadate in both groups of diabetic rats (Figure 3, Article

2 and Figure 2 A, Article 3), which was consistent with previous results obtained with vanadate and peroxovanadate (Meyerovitch *et al.*, 1987; Yale *et al.*, 1995). In streptozotocin-induced diabetic rats higher concentrations of vanadate were needed due to the higher glycemia levels. In the chronic treatments no changes in the circulating insulin levels were observed in either of the rat models: thus streptozotocin-induced diabetic rats remained hypoinsulinemic and Goto-Kakizaki diabetic rats remained hyperinsulinemic.

2.2. EFFECTS OF CHRONIC TREATMENT WITH BENZYLAMINE AND VANADATE ON PERIPHERAL TISSUES

Following chronic treatment we analyzed the metabolic state of adipose tissue and skeletal muscle to establish the mechanism by which the normoglucemic state was produced and to identify the tissues involved.

2.2.1. EFFECTS OF CHRONIC TREATMENT ON ADIPOSE TISSUE

The isolated adipocytes of streptozotocin-induced diabetic rats and Goto-Kakizaki diabetic rats present insulin resistance (Figure 5 results and figure 1 A, Article 3). In Goto-Kakizaki diabetic rats, the insulin resistance is only present at submaximal insulin concentrations. This observation may explain the slight hyperglycemia seen in these animals which is compensated by moderate hyperinsulinemia. In both models benzylamine and vanadate stimulate glucose transport to a similar extent as in non-diabetic animals; thus, there is no resistance to the combination of these two drugs. This is an interesting observation because resistance is one of the main problems of insulin therapy. Moreover, while in non-diabetic animals the stimulation with benzylamine and vanadate only reaches 70-80% of the maximal effect on insulin, in isolated adipocytes the two transports were similar.

In both groups of diabetic animals that had been chronically treated with benzylamine and vanadate, the basal glucose transport was enhanced (Figure 4, Article 2 A and Figure 22 of the results); this may contribute to the improvement of the glycemia observed *in vivo*.

Insulin-stimulated glucose transport increased in the streptozotocin-induced diabetic rats, but not in Goto-Kakizaki diabetic rats (Figure 4, Article 2 A and Figure 22 of the results). In the former the transport stimulated by benzylamine and vanadate also increased (Figure 15 of the results). We propose that in these rats adipose tissue is sensitized to later stimulus, either by insulin or by another molecule like benzylamine and vanadate. This sensitization may participate in the normoglycemia seen *in vivo*; after the treatment, the adipose tissue may be more sensitive to the small amounts of circulating insulin. The finding that basal glucose transport is also increased indicates insulin-like effects of the combination of

benzylamine and vanadate. Thus, while acute administration produced insulin-like effects, chronic treatment caused both insulin-like and insulin-sensitization effects in the adipose tissue. In the Goto-Kakizaki diabetic rats, such effects were not seen in the adipose tissue. Indeed, as mentioned above, these rats do not present insulin resistance at supramaximal insulin concentrations; only insulin-like effects on the basal glucose transport were observed.

The amount of GLUT1 transporter did not change in the streptozotocin-induced group (Figure 13 of the results); however, the total amount of GLUT4 transporter increased (Figure 5, Article 2). Streptozotocin-induced diabetic rats showed a reduction in the amount of this transporter when compared with non-diabetic rats (Sivitz *et al.*, 1992); thus, the chronic treatment with benzylamine and vanadate restores the levels of GLUT4 transporter. This recovery can explain, on the one hand, the enhancement of the basal glucose transport, if some of these transporters are at the plasma membrane; indeed, there is a correlation between the level of GLUT4 transporter and the basal glucose transport (Figure 14 of the results); and on the other hand, the sensitization to insulin and other molecules like benzylamine and vanadate that may cause a translocation of the intracellular enhanced pool of GLUT4 to the plasma membrane.

In Goto-Kakizaki diabetic rats the amount of GLUT1 or GLUT4 transporters in the adipocytes was unchanged; in fact, these rats present normal levels of glucose transporters (Kanoh *et al.*, 2000) (Figure 23 of the results). However, the amount of GLUT4 present at the plasma membrane in the basal situation was greater in the animals chronically treated with benzylamine and vanadate (Figure 2 C, Article 3); the amount of GLUT4 present at the plasma membrane in basal conditions correlates with the basal glucose transport, which suggests that the enhancement of the transporter is responsible for the enhancement of the basal glucose transport observed. The absence of change in the total amount of GLUT4 can explain the absence of insulin effects on the glucose transport of these rats.

The amount of adipose tissue was restored in the streptozotocin-induced diabetic rats chronically treated with benzylamine and vanadate; these rats had reduced their adipose tissue mass on the establishment of the diabetic state (Table 4, Article 2 and Figure 10 of the results). The biological function of SSAO in the adipose tissue is unknown but, on the basis of this observation and other data showing that SSAO acts as an adhesion protein in the endothelial cells (Bono *et al.*, 1998a; Smith *et al.*, 1998) we propose that SSAO could have a double function in the adipose cells. On the one hand it could control anabolic processes of the metabolism and on the other it could control the interactions between cells or between the cells and the extracellular matrix taking part in adipogenesis (differentiation and maturation of adipocytes).

In this regard, it was described that SSAO substrates can mimic other effects of insulin action. Recent studies have implicated SSAO and its substrates in adipocytes differentiation; thus, treatment of 3T3-F442A preadipocytes with benzylamine and vanadate for one week leads to acquisition of adipocyte morphology, stimulation of protein synthesis, accumulation of triacylglycerol and appearance of markers of adipocyte conversion (Fontana *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2001). Moreover, it was described that SSAO substrates can mimic the antilipolytic effects of insulin in human adipocytes (Morin *et al.*, 2001) which involve SSAO in the maturation process. The insulin-like effects of SSAO substrates in stimulation of adipogenesis and inhibition of lipolysis can enhance the adipose mass and explain the recovery of the epididymal adipose tissue observed in chronically treated streptozotocin-induced diabetic rats.

2.2.2. EFFECTS OF THE CHRONIC TREATMENT ON SKELETAL MUSCLE

The muscle is the tissue that consumes most circulating glucose during the absorptive state (DeFronzo *et al.*, 1981); thus, it may participate in the normalization of glycemia observed in the two models of diabetes. Moreover, in both models, insulin resistance in muscle has been described (Krook *et al.*, 1997; Wallberg-Henriksson and Holloszy, 1985).

In the streptozotocin-induced diabetic rats, only the total amount of GLUT1 and GLUT4 transporters in *soleus* and EDL muscle was studied. Though a reduction in the total amount of GLUT4 in the muscle with the establishment of the diabetic state has been reported (Richardson *et al.*, 1991) the treatment with benzylamine and vanadate did not affect the expression of these transporters (Figure 16 of the results). Despite the possible enhancement of the glucose transport and utilization in the muscle after the chronic treatment, this aspect was not studied.

In the Goto-Kakizaki diabetic rats, the study of the muscle metabolism was more extensive. These rats present clear insulin resistance in muscle (Song *et al.*, 1999) (Figure 2 C, Article 3). Chronic treatment with benzylamine and vanadate reverted insulin resistance to levels similar to those of non-diabetic rats (Figure 2 D, Article 3). In the *soleus* muscle the amount of GLUT4 was unchanged and the amount of GLUT1 increased in animals chronically treated with either vanadate alone or the combination of benzylamine and vanadate (Figure 25 of the results). The enhancement in GLUT1 did not correlate with an enhancement in the basal glucose transport. These results suggest that the chronic treatment with benzylamine and vanadate had sensitized muscle tissue.

In Goto-Kakizaki diabetic rats both the enhancement of the basal glucose transport in adipocytes and the insulin-sensitization in the muscle may be responsible for the restoration of normoglycemia *in vivo* following chronic treatment with benzylamine and vanadate.

We then examined the mechanism of the effects in muscle. Due to the absence of SSAO expression in skeletal muscle the possible direct effect of the combination of benzylamine and vanadate was ruled out. Indeed, benzylamine and vanadate did not stimulate glucose transport in muscle (Figure 3 B and C, Article 3). Due to the growing importance assigned to adipose tissue in whole body glucose homeostasis (Abel *et al.*, 2001) and its role as an endocrine organ (reviewed in Steppan and Lazar, 2002), involved in insulin resistance observed in muscle and liver, we evaluated the possibility that adipose tissue secreted an adipocytokine or a molecule that would affect the neighboring muscle. This hypothesis seemed feasible, since acute administration of benzylamine and vanadate stimulated glucose transport in muscle (Figure 3 A, Article 3).

The possible secretion of an adipocytokine was tested by real-time PCR in the adipose tissue of Goto-Kakizaki diabetic rats (Figure 28 of the results); no correlation between the improvement of glycemia and adipocytokine expression levels was observed. The possibility that circulating free fatty acids or triacylglycerides were the responsible for the changes observed in muscle was also ruled out (Figure 29 of the results).

Our next approach to determine the possible effect of adipose tissue in skeletal muscle was to assay whether a molecule rapidly generated in the adipose tissue, after the oxidation of benzylamine by SSAO, affects the muscle. To this end, coincubation experiments of adipose tissue explants and *soleus* strips were performed. These experiments demonstrated a stimulation of muscle glucose transport in the presence of benzylamine, vanadate and adipose tissue; this effect was dependent on SSAO activity (Figure 3 B, Article 3). Moreover, experiments with the human recombinant SSAO demonstrated that SSAO activity alone, without the rest of the adipose cell, was sufficient for glucose transport stimulation in muscle (Figure 3 C, Article 3). The molecule generated in the adipose tissue that affects the glucose transport in muscle may be peroxovanadate, due to its production in the presence of SSAO, benzylamine and vanadate (assayed by NMR, Figure 5 A, Article 3) and its insulin-like effects in the skeletal muscle (Tsiani *et al.*, 1998).

The acute effects in muscle are insulin-like, rather than sensitization to insulin as seen in the Goto-Kakizaki rats after the chronic treatment, because the coincubations were in the absence of insulin. However these are not insulin-like effects of benzylamine and vanadate directly but, probably, of peroxovanadate. These differences can be explained because in the case of Goto-Kakizaki diabetic rats there was a previous resistance that was improved by the treatment, while in the coincubations the muscles came from non-diabetic rats.

2.2.3. EFFECTS OF THE CHRONIC TREATMENT ON β-CELLS

Due to the effects observed on plasmatic insulin levels after the glucose tolerance test in Goto-Kakizaki diabetic rats the possible direct effect of the combination of benzylamine and vanadate on the pancreatic islet was assayed. Though pancreatic islets express SSAO (Figure 4 E, Article 3), their SSAO activity is low (Table 4 of the results). However, in contrast to the results obtained in skeletal muscle, direct effects of the combination of benzylamine and vanadate on insulin secretion were observed in islets from Goto-Kakizaki rats (Figure 4 D, Article 3).

Peroxovanadate can stimulate insulin secretion at low glucose concentrations but it inhibits the secretion at high glucose concentrations (Gogg *et al.*, 2001). In our case the effects observed *in vitro* are unlikely to be due to the peroxovanadate production, owing to the low SSAO activity present. However, the effects are only seen in the Goto-Kakizaki diabetic rat islets, which present an altered insulin secretion pattern, and not in Wistar rats. It was described that peroxovanadate, as in other tissues, can modify the phosphorylation level in the β cell (Gogg *et al.*, 2001); in Goto-Kakizaki rats it could compensate for phosphorylation alterations. The mechanism by which the insulin secretion pattern was altered in Goto-Kakizaki diabetic rats is not completely known but a decrease in the ATP/ADP ratio has been described (Abdel-Halim *et al.*, 1996) attributed to an enhancement of the glucose-6-phosphate activity (Ling *et al.*, 2001); other authors also suggest a decrease in the phosphorylated proteins implicated in insulin secretion. In this regard, enhancement in the expression of protein tyrosine phosphatase σ (PTPσ or LAR-PTP2) in the Goto-Kakizaki rats' islets has been described (Ostenson *et al.*, 2002); thus, the observed effects may be the result of the inhibition of this tyrosine phosphatase protein by peroxovanadate. The *in vivo* effects on the insulin secretion can be due to the peroxovanadate production in the pancreas or in the neighboring adipose tissue (see next chapter).

2.3. SSAO/VAP-1 EFFECTS ON GLUCOSE HOMEOSTASIS

The *in vivo* and *in vitro* data of benzylamine and vanadate action led us propose the following model: benzylamine reacts with SSAO, mainly in the adipose tissue, and peroxovanadate is produced in the presence of vanadate, which stimulates the glucose transport in the adipose tissue (Fantus *et al.*, 1989), the glucose transport in skeletal muscle (Tsiani *et al.*, 1998) and insulin secretion in the pancreatic islet (Gogg *et al.*, 2001). Thus, this drug combination allows the local generation of protein tyrosine phosphatase inhibitors in the adipose tissue which has both local effects and effects in the neighboring tissues. This model is schematized in figure 2.

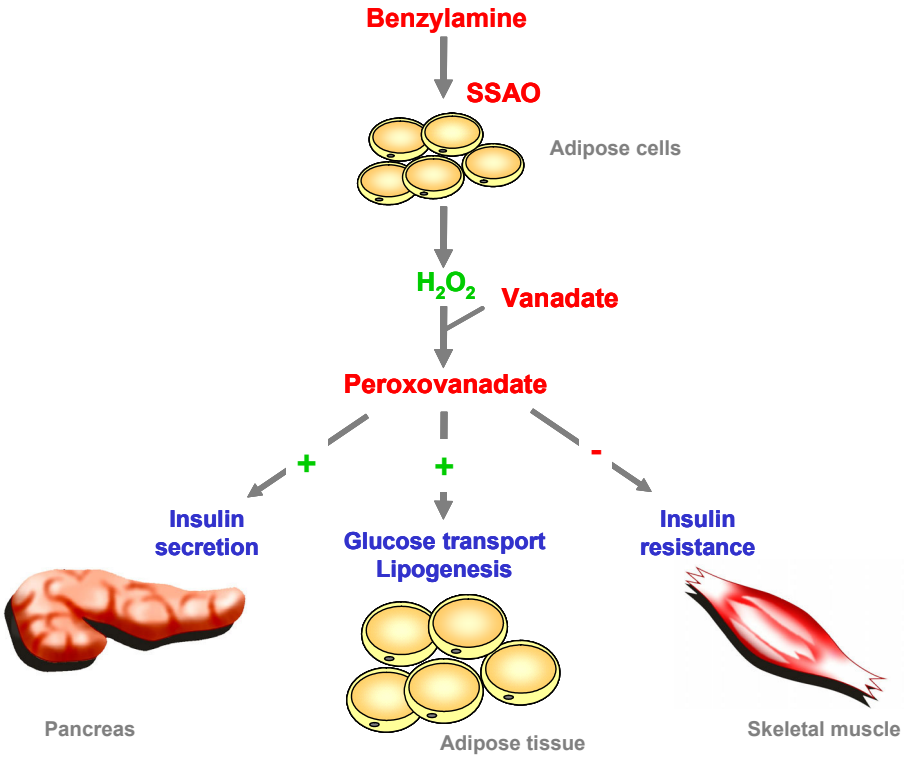


Figure 2. Model of the SSAO/VAP-1 cellular effects on glucose homeostasis.

Benzylamine and vanadate or peroxovanadate effects are both insulin-like and insulin-sensitization, depending on the animal model, whether administration is acute or chronic and the tissue affected. Moreover, in the pancreatic isled there are insulin-secretion effects attributable to the combination of benzylamine and vanadate.

In Goto-Kakizaki diabetic rats, for example, protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) activity is enhanced in the skeletal muscle (Dadke *et al.*, 2000); thus, the improvement of the insulin sensitization in the skeletal muscle after the chronic treatment with benzylamine and vanadate may be attributed to inhibition of this enhanced phosphatase activity by peroxovanadate produced in neighboring adipose tissue. Moreover, in these rats protein kinase B (PKB) activity after insulin stimulation is reduced 68% when compared with Wistar rats, though they have an equivalent protein expression (Krook *et al.*, 1997). All these data suggest a defect in protein phosphorylation, probably caused by the enhancement of the phosphatase activity in muscle. Due to the reversion of insulin resistance after chronic treatment with benzylamine and vanadate we propose a recovery of PKB activity after the insulin stimulation in treated Goto-Kakizaki diabetic rats. On the other hand, as commented above, the peroxovanadate generated in the adipose tissue near the pancreas could inhibit PTPσ in the pancreatic islet, which would stimulate insulin secretion.

Although the liver is an important contributor to the glycemic balance, glucose metabolism in this organ was not examined. Nevertheless, it may have a role in the effects observed; indeed, peroxovanadate activates insulin receptor in hepatocytes (Posner *et al.*, 1994). Further studies will be necessary to identify the role of the liver in response to the treatment with benzylamine and vanadate.

2.3.1. ADVANTAGES OF *IN SITU* PRODUCTION OF PEROXOVANADATE BY SSAO

Peroxovanadate generated *in situ* has advantages over exogenous administration due to its reactivity: local production reduces possible toxicity at untargeted sites and administration of peroxovanadate precursors avoids the necessity to administer high doses to compensate for loss.

The peroxovanadate production suggested that H_2O_2 rather than the aldehyde was responsible for the effects. The fact that substrates other than benzylamine also have similar biological effects reinforce this hypothesis:

1. Other substrates such as tyramine, methylamine, *N*-decylamine, β-phenylethylamine, histamine and *N*-acetylputrescine stimulate glucose transport in combination with vanadate in isolated rat adipocytes (Table 1, Article 1) or alone in human adipocytes (Morin *et al.*, 2001).
2. Chronic incubation with benzylamine, tyramine, methylamine or β-phenylethylamine of preadipocytes 3T3-F442A or 3T3-L1 stimulates adipocyte differentiation (Fontana *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2001).
3. Acute administration of tyramine enhances glucose utilization assayed by glucose tolerance test in streptozotocin-induced diabetic rats; this effect was blocked by semicarbazide (Morin *et al.*, 2002).
4. Chronic administration of tyramine and vanadate enhanced glucose utilization assayed by glucose tolerance test in streptozotocin-induced diabetic rats (Morin *et al.*, 2002).

A critical question for the use of the treatment in diabetic patients is the associated toxicity. In this regard, amine metabolization by SSAO generates biologically active product:; hydrogen peroxide (H_2O_2) and the concomitant aldehyde. On the other hand, the other molecule administered, vanadate, has not been developed as a therapeutic drug, despite its insulin-like effects, due to its toxicity. However, the proposed treatment is based in the utilization of apparently non-toxic concentrations.

H_2O_2, an oxygen reactive specie, despite its toxic effects at high concentrations, can act as an intracellular messenger at low concentrations, and it has been implicated in insulin

signal transduction. Due to the low concentrations of hydrogen peroxide produced by SSAO, comparable to the concentrations produced by NADPH-oxidase after insulin action (Krieger-Brauer and Kather, 1992), we propose that the H_2O_2 produced acts as an intracellular messenger or reacts with the vanadate and is non-toxic. Moreover, despite the evidence that implicates H_2O_2 in the enhancement of lymphocyte adhesion to endothelial cells (Johnston *et al.*, 1996); chamber flux assays, where H_2O_2 has been added, show that lymphocyte rolling on endothelial cells is not affected (Salmi *et al.*, 2001). H_2O_2 has also been implicated in SSAO regulation; the H_2O_2 produced by SSAO activity can inhibit bovine serum SSAO (Pietrangeli *et al.*, 2000).

Regarding the aldehyde, SSAO involvement in different vascular pathologies has been suggested. Oxidation of methylamine, a possible endogenous SSAO substrate, forms formaldehyde, a very reactive molecule that can contribute to the vascular complications of diabetes. Benzylamine may compete with methylamine for SSAO, forming benzaldehyde, a less toxic compound than formaldehyde. In diabetes enhancement of circulating SSAO and excretion of formaldehyde in urine have both been reported (Deng and Yu, 1999). Treatment with benzylamine and vanadate may thus be of interest because on the one hand, it may produce peroxovanadate with insulin-like or insulin-sensitization action and on the other hand, would avoid formaldehyde production. In this regard, we propose that the exogenous amine administration may represent a strategy to avoid formaldehyde production in diabetes.

Regarding vanadate administration, combined administration of benzylamine and vanadate produces peroxovanadate, a much more potent insulin-like agent (Fantus *et al.*, 1989); thus, the same insulin-like effects can be seen at lower vanadate concentrations. The potency of peroxovanadate as an insulin-like agent is due to its action mechanism; vanadate acts as a reversible inhibitor because it is a phosphate analogue that occupies the active site of tyrosine phosphatase proteins; peroxovanadate, on the other hand, acts as an irreversible inhibitor that oxidizes the critical cysteine at the catalytic site of these enzymes (Huyer *et al.*, 1997).

In animals, vanadate has commonly been given in the drinking water. It is active at doses between 0.15 and 1 mg/ml, 0.15 mg/dl of sodium metavanadate in the drinking water being the lowest effective dose for hyperglycemia reduction in streptozotocin-induced diabetic rats (Domingo *et al.*, 1995). These doses are accompanied by diarrhea and reduction of water and food consumption, which is associated with dehydration and weight loss; these effects can be reduced by adding NaCl to the drinking water and correcting its pH to 6-7. There are also other toxic effects that cannot be abolished and that are due to vanadate accumulation in several tissues. These effects are hepatotoxicity, nephrotoxicity, teratogenicity and developmental/reproductive toxicity (reviewed in Srivastava, 2000). The administration of chelating agents in combination with vanadate reduces the toxic

accumulation without reducing the hypogluceminat properties (Domingo *et al.*, 1993). In intraperitoneal administration of vanadate, which is used in our studies, the LD_{50} for sodium metavanadate is 18.4 mg/kg/day, which is equivalent to 7.7 mg vanadate/kg/day (Llobet and Domingo, 1984). In our case during the two weeks' chronic treatment a dose of 4.6 or 9.2 mg/kg/day (25 or 50 μmol/kg/day) of sodium orthovanadate was used, which correspond to 1.3 and 2.6 mg vanadate/kg/day respectively. During the acute glucose tolerance test a single dose of 3.4 mg/kg (20 μmol/kg) was given i.v., which correspond to 1 mg vanadate/kg/day; all these doses are ineffective by themselves. Moreover, the treatments that cause toxicity or death are accompanied by a reduction in food and water intake (Domingo *et al.*, 1995). In our case, despite the reduction in intake in the animals that received benzylamine and vanadate, those receiving vanadate alone maintained high levels of consumption. Thus, the reduction is not due to toxicity but to improvement of the diabetic state.

In some species the addition of vanadate is not necessary for the insulin-like effects of SSAO. Due to the insulin-like properties of H_2O_2 (Czech *et al.*, 1974; Taylor and Halperin, 1979), though less potent than peroxovanadate, if it is produced in a sufficient dose or if it is not rapidly detoxified, it can have effects by itself without vanadate addition. For example, in rat adipocytes, where there are potent detoxifying mechanisms, benzylamine or tyramine only stimulates glucose transport in the presence of vanadate (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1998). *In vivo*, in contrast, it is necessary to add vanadate to obtain benzylamine effects on glucose tolerance (Article 2), though with tyramine the effects occur in the absence of vanadate (Morin *et al.*, 2002). Tyramine is also metabolized by MAO, so production of H_2O_2 may be higher as a result of the action of both amino oxidase activities. In human isolated adipocytes, glucose transport is stimulated in the absence of vanadate (Morin *et al.*, 2001). In fact, human adipocytes have high SSAO activity (V_{max} = 6.6 *versus* 0.4-1.6 nmol benzylamine/ mg of protein / minute in human and in mouse, rabbit or pig respectively) (Raimondi *et al.*, 1992; Morin *et al.*, 2001). Higher concentrations of H_2O_2 may be reached, which are effective by themselves.

The biological effects of benzylamine and vanadate need active SSAO. The experimental evidences that lead us to this conclusion are as follows:

1. Glucose transport in isolated rat adipocytes is blocked by semicarbazide (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998).
2. Acute effects of benzylamine and vanadate on glucose deposition in non-diabetic rats and in streptozotocin-induced diabetic rats are blocked by pre-treatment with semicarbazide (Figure 2 B, Article 2).

3. Benzylamine and vanadate effects on muscle glucose transport in the presence of adipose tissue explants are not observed when semicarbazide is added (Figure 3 B, Article 3).
4. Benzylamine and vanadate effects on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets are not observed in the presence of semicarbazide (Figure 4 D, Article 3).
5. Benzylamine and vanadate effects on tyrosine phosphorylation of proteins and on the activation of IRS-1 and IRS-3 are not observed in the presence of semicarbazide (Figure 1 of the results, Figure 4, Article 1 and Figure 5 B, Article 3).

However, semicarbazide is not a specific inhibitor. In this regard it is important to search for selective and potent inhibitors of SSAO. SSAO knock-out animals may be studied to discern whether the effects are a result of this activity. Moreover, all our hypotheses are based on the use of benzylamine as an SSAO substrate; though benzylamine is mainly oxidized by SSAO it is also a substrate of MAO B (reviewed a Lyles, 1996). Adipocytes express mainly MAO A and low amounts of MAO B (Marti *et al.*, 1998) so the effects observed may involve SSAO (Marti *et al.*, 1998). However, the participation of MAO B cannot be ruled out *in vivo* and the absence of effects in the presence of semicarbazide suggests either that MAO B did not participate or that the H_2O_2 produced by this amino oxidase alone is not enough. When tyramine, a MAO A and MAO B substrate, is used *in vivo*, the glucose tolerance effects can be inhibited by both semicarbazide and pargyline (Morin *et al.*, 2002), which suggests that both molecules participate. In this regard, the development of more selective substrates for each of the amino oxidases may help in the identification of the activity responsible.

2.3.2. IMPORTANCE OF PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE

Peroxovanadate compounds are important, as previously mentioned, due to their capacity to inhibit tyrosine phosphatase proteins involved in the dephosphorylation of proteins that terminate the insulin-stimulated pathway. Moreover, the alteration of the tyrosine phosphatase activity, as described in the skeletal muscle and pancreatic islets of Goto-Kakizaki diabetic rats, contributes to the insulin-resistant state. Thus, the expression of specific tyrosine phosphatase proteins, like leukocyte antigen-related phosphatase (LAR), protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) and scr-homology phosphatase 2 (SHP2), is enhanced in the muscle and the adipose tissue of obese rodents and humans (Ahmad *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 1995; Ahmad and Goldstein, 1995b); moreover, enhancement of PTP-1B and SHP2 in skeletal muscle has been detected in diabetic rats (Ahmad and Goldstein, 1995a; Ahmad and Goldstein, 1995b).

LAR overexpression in the muscle causes insulin resistance associated with hyperinsulinemia, reduction of glucose global deposition and reduction of muscle glucose consumption (Zabolotny *et al.*, 2001). Moreover, overexpression of PTP-1B in adipose tissue reduces insulin-stimulated glucose transport (Chen *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1997). These results suggest that LAR or PTP-1B contributes to the pathogenesis of insulin resistance. Other results indicate that the inhibition of tyrosine phosphatase proteins could have beneficial effects; in this regard, PTP-1B knock out animals have higher insulin sensitivity and resistance to develop obesity induced by a fat diet (Elchebly *et al.*, 1999).

All these data suggest that inhibitors of proteins tyrosine phosphatase could be beneficial in diabetic or insulin resistance states. Benzylamine and vanadate administration and the consequent peroxovanadate formation in the neighbourhood of the target tissues may be a valid therapy. More studies will be necessary to demonstrate whether the combination of benzylamine and vanadate acts on the tyrosine phosphatase proteins implicated in insulin resistance and to identify the protein involved. The general inhibition of tyrosine phosphatase may have associated toxic effects; in this regard, it has been described that peroxovanadate can activate the MAP-kinase pathway, which leads to apoptosis in a rat insulinoma cell line (Rumora *et al.*, 2003).

3. ADIPOCYTES AS A SOURCE OF SSAO/VAP-1

Given the enhancement of soluble SSAO in diabetes (Boomsma *et al.*, 1995a; Garpenstrand *et al.*, 1999), the important role of adipose tissue in this pathology (Abel *et al.*, 2001) and the fact that adipose tissue express high amounts of SSAO (Barrand and Callingham, 1984; Morris *et al.*, 1997; Raimondi *et al.*, 1991) we examined whether adipose cells release circulating SSAO.

To this end, we performed two kinds of experiments: on the one hand, we determined the plasma SSAO in diabetic rats and in rats with a partial ablation of their adipose tissue; on the other hand, we studied the release of SSAO by cultured adipocytes and its regulation.

The study of SSAO activity in the plasma of streptozotocin-induced diabetic rats and in Goto-Kakizaki diabetic rats confirmed that this activity is enhanced in the diabetic state (Figure 7 A, Article 4). The ablation of epididymal and perirenal adipose tissue of Wistar rats reduced the SSAO activity in the plasma of these animals (Figure 7 B, Article 4). These results suggest the contribution of adipose tissue to the circulating SSAO activity levels, because either its reduction or its metabolic modification, associated to diabetes, affect SSAO circulation effects.

The correlation between SSAO present in the incubation medium and the amino oxidase activity of that medium (Figure 39 of the results) suggests that all the amino oxidase activity present in the medium is due to SSAO. This result is in accordance with previous data that demonstrated that: i) VAP-1 in serum is the only protein responsible for SSAO activity because the removal of VAP-1 by immunoaffinity chromatography eliminates all SSAO activity (Kurkijarvi *et al.*, 2000), ii) in human diabetes there is a correlation between an enhancement of SSAO activity in the circulation and the levels of the protein (Salmi *et al.*, 2002).

A more direct demonstration of SSAO release by the adipocytes was seen when the protein and the activity were detected in the cultured medium of 3T3-L1 adipocytes and in human adipose tissue explants (Figure 1 and 2, Article 4 and Figure 33 of the results). Moreover, it was demonstrated that the release was regulated by matrix metalloproteases (MMP); thus, its inhibition with batimastat reduced SSAO activity present in the culture medium (Figure 3, Article 4). MMP are a family of 24 neutral endopeptidases that break all the extracellular matrix compounds and other proteins, such as adhesion proteins. All MMP except MMP-8 have been identified in the adipose tissue of the mouse (Maquoi *et al.*, 2002); in two-week differentiated adipocytes MMP-2, -3, -7, -9, -10, -11, -12, -13, -16 and -24 show the highest expression (Maquoi *et al.*, 2002). MMP have been implicated in adipose tissue differentiation and metabolism; thus MMP-2, -3, -12, -14 and -19 are overexpressed in a model of diet-induced obesity (Chavey *et al.*, 2003) and MMP-3 knock out causes hypertrophy in the development of adipose tissue. SSAO regulation by MMP suggests a role of SSAO in the development of adipose tissue, as was suggested by the capacity of SSAO substrates to stimulate adipocyte differentiation (Fontana *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2001).

On the other hand, the inhibition of SSAO in 3T3-L1 cells by semicarbazide enhances SSAO release (Figure 6, Article 4), which suggests that the activity is needed in the membrane or in the medium to maintain a normal release pattern. Thus, the mechanism of SSAO release seems to be controlled by SSAO activity. Moreover, H_2O_2 can regulate MMP (Yoon *et al.*, 2002), so the absence of H_2O_2 production may affect the normal pattern of SSAO release via MMP. More studies are necessary to confirm the importance of H_2O_2 in SSAO release.

Tumor necrosis factor alpha (TNFα), implicated in insulin resistance, and the intracellular messenger cyclic-adenosine momophosphate (cAMP), a key factor in adipocyte metabolism (Hotamisligil *et al.*, 1993; Piper *et al.*, 1993), enhance SSAO release (Figure 4 and 5, Article 4). This result suggests that the enhancement of circulating SSAO observed in diabetes may be due to an enhancement of the enzyme release by the adipose tissue regulated by these factors. In this sense, enhancements in TNFα in insulin resistance states have been described (Hotamisligil *et al.*, 1995). Moreover TNFα increases adhesion protein

release in other cellular models (Leung, 1999). cAMP production by adenylate cyclase after a β-adrenergic stimulus has a lipolytic effect in the adipose cell; insulin exerts antilipolytic effects via the activation of PDE (phosphodiesterase) that hydrolyze cAMP to AMP (Bolinder *et al.*, 1996; Chatzipanteli and Saggerson, 1983). In type 1 diabetes *mellitus*, where there is no insulin, cAMP is enhanced; this will enhance SSAO release by adipose tissue, which could participate in the enhancement of the circulating levels seen in the diabetic state; this mechanism may operate in streptozotocin-induced diabetic rats. Moreover, due to the lipolytic effects of cAMP, streptozotocin-induced diabetic rats lose adipose mass with the establishment of the diabetic state; besides the partial loss of adipose tissue the circulating levels of SSAO are increased in these animals, probably due to the enhanced release by the remaining adipocytes due to cAMP action. Figure 3 schematizes SSAO release by adipose cells.

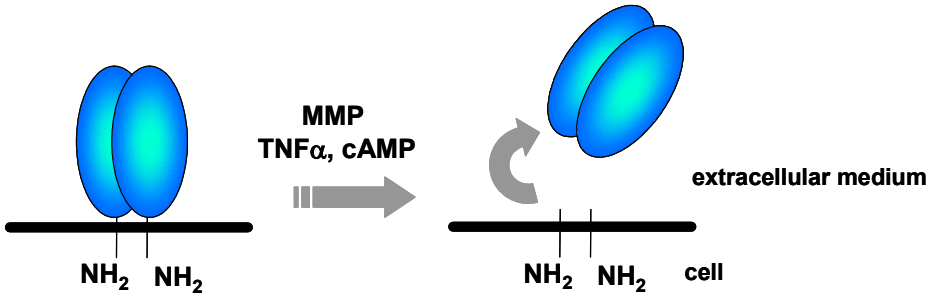


Figure 3. SSAO release mechanism by the adipose cell.

While in control conditions, after two days of incubation, the protein in the culture medium accounts for 0.63% of total membrane activity (278 ± 13 pmol/h/plate activity in the medium *versus* 290 ± 40 pmol/min/mg of protein activity in the homogenates); in cells treated with TNFα it was 1.76% (455 ± 103 pmol/h/plate and 172 ± 55 pmol/min/mg of protein; activity in the medium and in the homogenates respectively) and 1.51% after the treatment with cAMP (647 ± 100 pmol/h/plate and 285 ± 52 pmol/min/mg of protein; activity in the medium and in the homogenates respectively). Since there are 14 x 10^6 copies of SSAO per cell (Morris *et al.*, 1997) and in each culture plate there are 4 x 10^4 cells, in normal conditions we can expect to find 5 x 10^{11} copies of SSAO after two days of incubation, and in the adipocytes treated with TNFα or cAMP the number of SSAO in the culture medium will be 9.9 x 10^{11} and 8.5 x 10^{11} respectively. Although the percentage of the SSAO released may seem small, the amount released is quite important due to the high amount of SSAO in the cell. In the presence of TNFα and cAMP the amount of SSAO released is approximately double that in control conditions; interestingly, in diabetes the amount of circulating SSAO is also approximately doubled (Figure 7, Article 4).

The results obtained during this thesis that are reported in article 4, suggest that the soluble form of SSAO is produced by the proteolytic cleavage (shedding) of the membrane form, these results are the following:

1. A 2 kDa reduction in the soluble form is consistent with the loss of the transmembrane and cytoplasmatic domains (Figure 2 B, Article 4) (Smith *et al.*, 1998).
2. Km values of benzylamine oxidation by the enzymatic activity in the medium and in the membrane are similar (43 ± 8 μM and 25 ± 5 μM respectively) (Figure 1 B, Article 4).
3. The soluble protein and the membrane-bound protein present the same amount of glycosylations and sialic acid residues (Figure 2 B, Article 4).
4. The metalloprotease inhibitor batimastat reduced SSAO activity and protein in the medium of 3T3-L1 and humans adipocytes between 80 and 95% (Figure 3, Article 4).
5. Moreover, another member of the family of amino oxidases with carbonyl sensible cofactor, lysyloxidase, is synthesized as a precursor and is released to the extracellular space, where it is active, after proteolytic cleavage by the metalloprotease PCB/BMP-1 (Panchenko *et al.*, 1996).

The literature reports several lines of evidence in support of the hypothesis that the soluble form of SSAO comes from the same gene as the membrane-bound form, possibly by a shedding process rather than by alternative splicing. Other evidence, not referring to the human forms, suggests the existence of two separate genes. The evidence is as follows:

Evidence for the existence of a single gene for the membrane and soluble proteins:

1. Kinetic studies by Lizcano and co-workers indicate that the soluble and membrane forms of bovine SSAO have the same kinetic constants (Lizcano and Unzeta, 2000).
2. In humans, the soluble protein can be produced from the membrane form expressed in the hepatic endothelial cells (Kurkijarvi *et al.*, 2000).
3. In humans, the SSAO genes described (AOC2 and AOC3) form a cluster in the long arm of chromosome 17 and are the only ones identified in the published human genome (Jalkanen and Salmi, 2001). In mouse, the search for homologous genes to mVAP-1 in the published genome only identifies mDAO and a protein homologous to hRAO.

Evidence for the existence of two separate genes for the membrane and soluble proteins:

1. Kinetic studies indicate that sheep membrane and soluble forms have different kinetic constants (Boomsma *et al.*, 2000; Elliott *et al.*, 1992).

2. The amino acid sequence of the N-terminal part of circulating bovine SSAO has no homology with the membrane forms cloned in different species. Between arginine 16, the first aminoacid of the soluble bovine form, and a cysteine present in the transmembrane domain, cysteine 41 of the human and mouse membrane forms or cysteine 40 in the soluble bovine form (Mu *et al.*, 1994) (see alignment in figure 13 of the introduction) there is no homology; after this cysteine the homology is greater.
3. In 1998 Hogdall and co-workers described the partial cDNA of the membrane form of the bovine protein, which has 94% homology with the BSAO (Hogdall *et al.*, 1998). In a genomic bovine library they found 3 genes: the first, expressed in lung, liver, heart and spleen, encodes the membrane form; the second, expressed in the liver, encodes the soluble form and the last one encodes bDAO. Despite this description the sequence for the N-terminal of the membrane form is not completely accepted; thus, Lizcano and co-workers found differences in 50% of the aminoacids (Lizcano and Unzeta, 2000).
4. There is a sequence in the NCBI (AB019242) (Iwabuki *et al.*, 1998) that describe the bovine membrane form of SSAO; this sequence has high homology with the rest of the published sequences for the membrane form and is different from the sequence described by Hogdall, where the N-terminal sequence of the membrane form was similar to the soluble one.
5. In pigs, the purification of the membrane form of the aorta and the soluble form showed a difference in the sequence of the active site. While there was a valine after the consensus sequence (Asn-Tyr-Asp-Tyr) in the soluble form, the membrane form contained a tyrosine (Holt *et al.*, 1998).

Regarding the physiological function of he soluble form, it has been implicated in the activation of the lymphocytes before adhesion to the endothelial cells (Kurkijarvi *et al.*, 1998). An enhancement in the SSAO soluble form, as seen in many diseases, can cause: i) accumulation of lymphocytes in the vasculature, ii) endothelial dysfunctions via the potential cytotoxic effects of the products of SSAO catalysis: ammonium, aldehyde and hydrogen peroxide (Callingham *et al.*, 1990). These processes have been related in atherogenic lesions (Meszaros *et al.*, 1999; Yu and Deng, 1998) and in the development of the angiopathy and retinopathy seen in diabetes (Yu and Zuo, 1993; Yu and Zuo, 1997). Adipose tissue, as a source of soluble adhesion molecules, could participate in the cardiovascular complications associated with diabetes. On the other hand, there is evidence that, in spite of its putative toxic effects, SSAO is also necessary for the correct function and development of the vascular system (Langford *et al.*, 1999; Langford *et al.*, 2002); in this sense, SSAO inhibition has been related to various pathologies (Lewinsohn, 1977; Lizcano *et al.*, 1991). More studies are necessary to establish the functional role of SSAO/VAP-1 in the circulation.

Here we describe the release of an adhesive protein, SSAO/VAP-1, by the adipose tissue, which implicates this tissue in the chronic complications associated with diabetes *mellitus*. Further studies with SSAO knock-out animals may allow us to confirm these results. Plans for future studies include: i) analysis of the release by adipose tissue of other adhesive proteins, also enhanced in diabetes; because loss of body weight in obesity correlates with a reduction of the soluble levels of adhesion proteins (Ferri *et al*., 1999); ii) the release of SSAO in cell models other than adipose cells that express abundant SSAO protein, such as the smooth muscle cells, also involved in the cardiovascular complications; iii) the paracrine/autocrine function of the soluble SSAO in adipose cells and the endocrine function in other cell types, such as smooth muscle cells or endothelial cells of the vasculature. These studies may resolve the putative toxicity of SSAO on the vasculature, which has been implicated in the atherogenic problems and the vasculature toxicity associated with diabetes *mellitus*.

CONCLUSIONS

1. SSAO substrates in combination with vanadate stimulate glucose transport in adipocytes in conditions where peroxovanadate is produced, protein tyrosine phosphatase activity is inhibited and IRS-1, IRS-3, PI3K and protein kinase B are activated.

2. Acute administration of benzylamine and vanadate enhances glucose tolerance in non-diabetic, streptozotocin-induced diabetic and Goto-Kakizaki diabetic rats; it also stimulates muscle glucose transport by a mechanism that requires, at least *in vitro*, SSAO activity.

3. Chronic administration of benzylamine and vanadate normalizes glycemia of streptozotocin-induced and Goto-Kakizaki diabetic rats.

4. In streptozotocin-induced diabetic rats, chronic administration of benzylamine and vanadate enhances basal and insulin-stimulated glucose transport and the total amount of GLUT4 in adipocytes. In Goto-Kakizaki diabetic rats, chronic administration of benzylamine and vanadate enhances glucose transport and the amount of GLUT4 present at the plasma membrane in adipose cells in non-stimulated conditions, and insulin-stimulated glucose transport in *soleus* muscle.

5. In Goto-Kakizaki diabetic rats, the combination of benzylamine and vanadate stimulates insulin secretion in pancreatic islets and its acute administration leads to the recovery of the first phase of insulin secretion.

6. The peroxovanadate produced by SSAO activity in the presence of vanadate inhibits protein tyrosine phosphatase activity. The local generation of peroxovanadate by SSAO activity could represent a new strategy for the treatment of diabetes *mellitus*.

7. 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue explants release soluble SSAO to the culture medium in a matrix metalloprotease-dependent process regulated by factors implicated in insulin resistance such as TNFα and cAMP. The enhanced release of SSAO by adipose tissue could participate in the enhancement of the soluble SSAO form observed in diabetes.